


ORIGINAL

INSTRUCCIONES:

- 1.- LLENE SOLAMENTE LOS RECUADROS DE TONO ROSADO CON CARÁCTERES NEGROS DE MAQUINA (NO MANUSCRITO)  
 2.- SE ENTIENDE POR PRIORIDAD AQUELLA PROTECCION SOLICITADA O CONCEDIDA ANTERIORMENTE POR EL MISMO INVENTO, GENERALMENTE EN EL EXTRANJERO

22 FECHA DE SOLICITUD DIA MES AÑO		 <b>REPUBLICA DE CHILE</b> MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION SUBSECRETARIA DE ECONOMIA DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL	11 NUMERO DEL PRIVILEGIO
41 FECHA DE PUBLICACION DIA MES AÑO			21 NUMERO DE SOLICITUD <b>165695</b>
12 TIPO DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> TRANSFERENCIA <input type="checkbox"/> CAMBIO DE NOMBRE <input type="checkbox"/> LICENCIA		PRIORIDAD: TIPO <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL ESTADO <input type="checkbox"/> CONCEDIDA <input checked="" type="checkbox"/> EN TRAMITE	DOCUMENTOS ACOMPARADOS <input type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA en inglés <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input type="checkbox"/> DIBUJOS <input type="checkbox"/> PODER <input type="checkbox"/> CESION <input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD <input type="checkbox"/> PROTOTIPO <input type="checkbox"/> CERTIFICADA <input type="checkbox"/> TRADUCIDA AL ESPAÑOL
31 No: 08/330.947 y 08/475.992 33 PAIS: E.U.A. 32 FECHA: 28 Octubre 1994 y 7 Junio 1995			
TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD  <b>UN RECOMBINANTE DE DNA CON UN TRANSGEN.</b>			
71 SOLICITANTE(S): (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAIS, TELEFONO) <b>AMERICAN NATIONAL RED CROSS</b> <b>The Jerome H. Holland Labs.</b> <b>15601 Crabbs Branch Way</b> <b>Rockville, Maryland 20855</b> <b>E.U.A.</b>			
72 INVENTOR O CREADOR: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAIS, TELEFONO) <b>Gilbert JAY, británico</b>			
74 REPRESENTANTE: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, TELEFONO) <b>ESTUDIO ARTURO ALESSANDRI</b> <b>Amunátegui 277 - Piso 3°</b> <b>Santiago</b> <b>Mario Silva M., Rodrigo Cooper C., Felipe Cousiño P.</b>			
DECLARO/DECLARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS RECUADROS DE TONO ROSADO SON VERDADEROS Y TAMBIEN CONOZCO EL ART. 44 DE LA LEY Nº 19.039 SOBRE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y QUE EL PRESENTE DOCUMENTO CONSTITUYE UNA SOLICITUD FORMAL.		RECEPCION DEPTO. PROP. INDUSTRIAL RECEPCION DE DOCUMENTO 27.06.1995 CHILE INVENTOS DE INVENCION	
FIRMA Y R.U.T. REPRESENTANTE Rodrigo Cooper C. 82.864.700-8		FIRMA Y R.U.T. SOLICITANTE	

HOJA TECNICA



REPUBLICA DE CHILE  
MINISTERIO DE ECONOMIA  
FOMENTO Y RECONSTRUCCION  
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA  
DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL

(19) PAIS CHILE

(12) TIPO DE SOLICITUD:

- ☐ INVENCIÓN (A) ☐ PRECAUCIONAL (PR)
- ☐ PRIMARIA (1) ☐ MODELO DE UTILIDAD (U)
- ☐ ADICIONAL (2)  
(PERFECCIONAMIENTO)  
A LA PATENTE Nº : ☐ REVALIDA (R)

(21) Nº DE SOLICITUD : ,

(11) Nº DE PATENTE:

1656-PS

(72) INVENTOR:

(74) AGENTE:

(19) CL (12)	(41) DISP.	D	M	A	(51) CIP <sup>5</sup>
(21)	(22) SOL.				
(11)	(24) VIG.				
(30) <input type="checkbox"/> PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> REVALIDA	D	M	A	
PAIS Nº					

(71) SOLICITANTE: AMERICAN NATIONAL RED CROSS

PAIS: ESTADOS UNIDOS  
DE AMERICA

DIRECCION : 15601 Crabbs Branch Way  
Rockville, Maryland 20855

(64) TITULO: UN RECOMBINANTE DE DNA CON UN TRANSGEN.

(67) RESUMEN, PALABRAS CLAVE Y DIBUJO O FORMULA:

Transgene que comprende un promotor heterólogo operablemente ligado a una secuencia de ácido nucleico que consiste esencialmente en una secuencia codificadora de ADN para péptido Aβ de rata, y que es útil en el combate contra la enfermedad de Alzheimer que constituye un desorden neurodegenerativo, caracterizada por un deterioro progresivo de la memoria y el conocimiento.

El invento también comprende un método para separar un compuesto en un fenotipo mediado por la expresión de un péptido Aβ transgénico en el cerebro de un mamífero para observar si resulta un efecto en el genotipo.

El invento también comprende la producción de un mamífero transgénico que tiene dicho genotipo en su cerebro de donde es posible usarlo como fuente de Aβ para el objeto indicado.

El transgen~~x~~ de los procedimientos indicados constituye novedad por no existir nada semejante.

## MEMORIA DESCRIPTIVA

1656-95

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo, caracterizado por un deterioro progresivo de la memoria y el conocimiento. Las características histopatológicas prominentes de esta enfermedad incluyen depósitos extracelulares de amiloides y la acumulación intra-celular de haces neuro-fibrilares (1). Las características celulares principales de esta enfermedad son la degeneración y pérdida eventual de células neuronales. Esta degeneración, a menudo profunda, afecta muchos tipos de neuronas y puede ser responsable de numerosos déficits neurológicos, que encuentran los pacientes afectados por ella. La degeneración más notable ocurre en el hipocampo, la corteza cerebral y la amígdala (2), regiones del cerebro que juegan un rol importante en la memoria, el conocimiento y la conducta.

Aunque, los depósitos amiloideos han sido el foco de mucha atención, su rol en la patofisiología de AD permanecen sin clarificar. Los depósitos amiloideos pueden ocurrir como agregados difusos o como depósitos densos que, junto con estructuras neuríticas degenerativas se designan colectivamente como placas seniles. El principal componente protéico de estas placas es un péptido de 43 aminoácidos denominado  $\beta$ -amiloide o AB (3, 4) que es derivado de una proteína más grande de la trans-membrana, la proteína precursora AB (APP), que puede existir con varias isoformas diferentes (5-7).

La generación de AB desde APP se ha visto que es un proceso normal (8-10), y AB puede ser detectado en el

fluido cerebro-espinal y en el plasma de ambos, pacientes normales y con AD (9, 11). Sin embargo, el proceso por el cual A $\beta$  se acumula en el cerebro enfermo es desconocido, aunque mutaciones en el gen ~~APP~~, ligado a AD familiar, puede alterar su proceso y conducir a niveles más altos del péptido A $\beta$ . De hecho, estudios recientes in vitro han mostrado que células transfectadas con diferentes formas mutadas de APP acumulan, al menos a un nivel seis veces mayor de A $\beta$ , comparado con células transfectadas con el tipo salvaje de APP (12, 13).

Varios grupos han mostrado que el recorrido endosomal/lisosomal es un recorrido principal de proceso que conduce a los precursores potenciales de A $\beta$  (8-10). Pese a estas revelaciones recientes, que conciernen a los eventos pro-sales que pueden resultar en la formación del péptido A $\beta$  (8-10), aún no está claro si los altos niveles de acumulación de este péptido dentro de los cerebros de individuos con AD representa una causa o una consecuencia del daño neuronal. Para averiguarlo, se ha empleado estudios in vitro para analizar la toxicidad de este péptido. Mientras algunos investigadores han encontrado que agregando péptidos A $\beta$  sintéticos, así como varios fragmentos de APP, puede ser citotóxico a células en cultivo, otros han sido incapaces de reproducir estos hallazgos (revisado en las referencias 14, 15). Del mismo modo, los intentos para estudiar esta materia in vivo también han dado resultados conflictivos, porque algunos grupos han confirmado la neurotoxicidad de A $\beta$  in vivo, mientras otros no lo han logrado (15).

Otra aproximación diseñada para investigar la toxicidad de A $\beta$  in vivo ha incluido la generación de animales transgénicos. Las ratas transgénicas que expresan el péptido A $\beta$  humano (16-18), el terminal-C de 100 aminoácidos de APP (19-22), un cADN de largo completo para APP humano (23, 24), o el gen completo APP (25, 26) mismo han sido generados bajo el control

de varios elementos promotores transcripcionales. Todavía no se ha informado que estas ratas desarrollen cualquier patología significativa, tal vez debido a razones técnicas, tales como la selección de un promotor inapropiado, bajos niveles de expresión, la inhabilidad de las ratas para procesar la molécula del precursor humano, o la inhabilidad para distinguir su efecto de los efectos genéticos de fondo de la cepa huésped de rata.

Así, aún permanece la necesidad de un modelo de animal transgénico para AD y otras enfermedades asociadas con la expresión del péptido A $\beta$ .

La invención se relaciona con un ADN recombinante y un transgénico, cada uno comprendiendo un promotor operablemente ligado a una secuencia de ADN, que codifica para un péptido  $\beta$ -amiloide, A $\beta$ , y una célula huésped o animal completo que contenga el ADN recombinante o el transgénico. La secuencia codificadora de A $\beta$  puede ser obtenida de la misma, o una diferente especie que la célula o especie mamífera dentro de la cual se ha agregado. Preferiblemente, la especie huésped es una rata.

El péptido A $\beta$ , o A $\beta$ , es un componente principal de la proteína de las placas seniles observadas en el cerebro de pacientes humanos con enfermedad de Alzheimer. En humanos y ratas, A $\beta$  es un péptido de 42 aminoácidos (3, 4; Yamada et al., 1987, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 665 - 671) derivados de una proteína más grande de transmembrana, la proteína precursora de A $\beta$  (APP), que existe en varias isoformas diferentes (5, 6, 7). Los depósitos del péptido A $\beta$  han sido implicados en AD, Síndrome de Down, y HCHWA-D.

Una secuencia de ácidos nucleicos, que consiste esencialmente de una secuencia codificadora para un péptido A $\beta$  significa esencialmente, sólo la secuencia del ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un péptido A $\beta$ . Por



Una secuencia del péptido A $\beta$ , de un mamífero mutante, también puede usarse de acuerdo a la presente invención. Tal secuencia mutante, por ejemplo, puede ser una secuencia que ocurre no naturalmente, o una secuencia que copia una mutación ya encontrada en la naturaleza. Por ejemplo, existe una enfermedad humana, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo Dutch (HCHWA-D), clínicamente caracterizada por hemorragias cerebrales e infartos recurrentes. En esta enfermedad la deposición del péptido A $\beta$  se encuentra predominantemente en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales y, en menor grado en la neurópila. Una mutación en la posición 22 de A $\beta$ , que resulta en el reemplazo del ácido glutámico con glutamina, se ha identificado que está asociada con la enfermedad. Para expresarlo en rata, la secuencia humana HCHWA-D que codifica al péptido A $\beta$  puede ser usada directamente, o puede hacerse una secuencia derivada, en la cual el ácido glutámico es reemplazado con glutamina en el péptido A $\beta$  de rata, en la correspondiente posición 22. Ver Figura 9. Una secuencia mutante también puede identificarse por mutagénesis, ya sea en animales enteros o en cultivos celulares, usando tecnología convencional. Por ejemplo, secuencias mutagenizadas A $\beta$  pueden transformarse en células, y las células transformadas pueden separarse mediante la sobre expresión o expresión aberrante del péptido A $\beta$ , por ejemplo, por inmuno ensayo.

La fuente de la secuencia codificadora del ácido nucleico puede ser una secuencia A $\beta$  natural o mutante, obtenida de un mamífero en el cual está presente. La secuencia codificadora también puede ser sintética, ya sea total o parcial, basada en un gen APP o una secuencia de proteína. El gen APP que codifica al péptido A $\beta$  ha sido clonado en una cantidad de especies diferentes, incluyendo ratas: Yamada et al., 1987 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 665 - 671; ratones: Shivers et

al., 1988, *EMBO J.* 1365 - 1370; humanos: Kang et al., 1987, *Nature* 325, 773 - 736; Ponte et al., 1988, *Nature* 331, 527 - 530; Tanzi et al., 1988, *Nature* 331, 530 - 533. Otros genes APP pueden identificarse y clonarse rutinariamente, por ejemplo, usando hibridización, expresión de anticuerpos, o reacción de polimerasa en cadena (PCR), por ejemplo, con secuencias conservadas. La fuente del péptido A $\beta$  puede ser la misma especie que la especie en la cual será expresada, o puede ser diferente. En un ejemplo preferido, la fuente del péptido A $\beta$  es rata cuando será expresada en rata.

Una secuencia promotora heteróloga puede estar operablemente ligada a una secuencia de ADN que codifica para un péptido A $\beta$ . Por "operablemente ligada" se entiende que el promotor heterólogo está unido a la secuencia codificadora del péptido A $\beta$ , en una forma que permite la expresión de esa secuencia para ser controlada y, la producción del péptido A $\beta$  codificada. El péptido puede acumularse intra o extra celularmente. La secuencia promotora heteróloga preferiblemente es una secuencia promotora neurona-específica, por ejemplo, una secuencia promotora que es activa en células neuronales, preferiblemente, la secuencia promotora es más activa en células neuronales que en otros tipos de células. Los ejemplos de secuencias promotoras neurona-específicas son la neurona-enolasa, la proteína de célula-Purkinje, distrofina, neurofilamento, preferiblemente un promotor de ~~gene~~ neurofilamento-liviano (30). La especificidad neuronal puede aumentarse, por ejemplo, incluyendo intrones que son parte de la secuencia codificadora del gene, tales como la inclusión del primer intrón del gen de neurofilamento. La secuencia promotora heteróloga puede ser también, por ejemplo, amplificable, inducible, regulada por el desarrollo, etc., sólo o en combinación con un promotor neurona-específico. Así, el pro-



motor heterólogo puede ser un híbrido que contiene elementos de varios promotores, incluyendo el promotor del gen~~X~~ APP mismo.

Una molécula recombinante de ácido nucleico, de acuerdo a la presente invención, es una molécula de ácido nucleico que no ocurre naturalmente. Tal ácido nucleico contiene una unidad de un promotor operablemente ligado a una secuencia que codifica substancialmente sólo para péptidos A $\beta$ . Puede ser usado de varias formas, por ejemplo, como una herramienta de investigación o sonda, por ejemplo, o para efectuar la expresión de un péptido A $\beta$  en una célula, o mamífero completo, dentro del cual se introduce. Para propósitos de expresión, tal ADN recombinante también comprende un sitio de unión de ribosomas, secuencias de iniciación de traducción, secuencia consensual de Kozak, una secuencia codificadora para APP, o un fragmento de ella, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, por ejemplo, aquellas secuencias de ácido nucleico útiles para lograr la expresión de un péptido A $\beta$ . Un ácido nucleico recombinante puede además comprender secuencias magnificadoras, que modulan la expresión del gen~~X~~, secuencias de intrones, y secuencias de nucleótidos laterales 5' y 3' de un gene APP u otro gen deseado. Una secuencia de ácido nucleico, de acuerdo a la presente invención, puede ser modificada para mejorar la expresión de una secuencia codificadora de ácido nucleico para A $\beta$ , por ejemplo, mediante la adición de secuencias magnificadoras o alterando la información de la secuencia de nucleótidos, para eliminar la estructura secundaria del mRNA que reduce o interfiere con la traducción. Ver, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, Volumen 185, Academic Press, 1990, especialmente los capítulos 38 - 44. Por "transgen~~X~~" se entiende un ácido nucleico recombinante que contiene información para expresar un péptido A $\beta$  en un animal al cual se le ha introducido, por ejemplo, un promotor, una secuencia ligadora de ribosomas, una secuencia Kozak, por

ejemplo, CCPuCCAUGG o CCA/TCCA (ver Kozak, Nucl. Acid. Res., 12, 857 - 872, 1984), secuencias de iniciación de la traducción, magnificadores, intrón, y/o secuencias de poliadenilación. Tal transgene~~x~~ puede contener más de una secuencia codificadora. Estas secuencias usadas para efectuar la expresión, se conocen generalmente en el arte y se discutieron anteriormente.

La presente invención también incluye un mamífero transgénico que contiene en algunas o todas sus células, un ADN recombinante, o un transgene~~x~~, que comprende un promotor operablemente ligado a una secuencia de ADN, que codifica substancialmente para péptidos A $\beta$ . En un aspecto de la invención, un promotor heterólogo y péptido A $\beta$  se obtienen de la misma especie de mamíferos a la cual serán introducidos por transformación; preferiblemente, esta especie es rata.

La creación de un mamífero transgénico puede lograrse rutinariamente. Un mamífero transgénico puede hacerse mediante, por ejemplo, inyectando directamente un transgene~~x~~ en un embrión, usando un retrovirus que lleva el ácido nucléico recombinante, o empleando la metodología del tallo celular embriónico. Ver, por ejemplo, las Patentes U.S. N° 4.173.866; N° 4.873.191; N° 4.873.316; N° 5.082.779; N° 5.304.489; N° 5.174.986; N° 5.175.384; N° 5.175.385; y N° 5.221.778. Para conseguir la transformación embriónica, un ADN que comprende la secuencia A $\beta$  deseada se introduce por microinyección dentro de un pronúcleo de un embrión fertilizado de una célula. Ver, por ejemplo, Gordon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 7380 - 7384 (1980); Palmiter et al., *Cell*, 41: 343 - 345 (1985); Palmiter et al., *Ann. Rev. Genet.*, 20: 465 - 499 (1986). Otros métodos también pueden ser usados, con el propósito primario de introducir el ácido nucléico recombinante dentro de las células del organismo, en una forma en que puedan ser expresadas. Por ejemplo, el transgene~~x~~ puede inyectarse en un

huevo fertilizado de rata, antes de la fusión entre el espermatozoide y el huevo; así, si la integración dentro del genoma de ADN ocurre, cada célula del embrión heredará el transgene.

El término "mamífero" como se usa aquí incluye a todos los mamíferos, excepto los humanos. También incluye un mamífero individual en todos los estados de desarrollo, incluyendo las etapas embriónicas y fetales. Un "mamífero" transgénico es cualquier mamífero que contiene una o más células que llevan la información genética recibida, directa o indirectamente, por manipulación genética deliberada a nivel sub-celular, tal como por microinyección o infección con un virus recombinante de otro organismo, distinto de sus padres. El término no intenta abarcar el cruzamiento clásico, sino que intenta comprender a mamíferos en los cuales una o más células reciben una molécula de ácido nucleico recombinante. Esta molécula puede ser integrada dentro de un cromosoma, o puede ser un ácido nucleico replicándose extracromosomalmente. El término "línea de células germinales de mamífero transgénico" se refiere a un mamífero transgénico en el cual la información genética fue introducida en una línea de células germinales, confiriéndole la habilidad de transferir la información a su descendencia. Si tal descendencia, de hecho, posee alguna o toda la información, ellos también serán mamíferos transgénicos. Un mamífero transgénico también puede ser una quimera, en la cual la información genética, por ejemplo, el ADN recombinante que comprende un péptido A $\beta$  está presente en sólo algunas células del organismo completo.

La información genética puede ser extraña a la especie de mamífero a la cual pertenece el recipiente, extraña sólo al recipiente individual particular, o la información genética puede estar ya en posesión del recipiente. El gen~~x~~ introducido puede ser expresado diferencialmente, en comparación con

el del gen~~o~~ nativo, por ejemplo, temporal, espacial o cuantitativamente.

El ácido nucléico recombinante, o transgen~~o~~, puede ser introducido dentro de cualquier mamífero, incluyendo una rata (Hogan et al., 1986, en *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), cerdo (Hammer et al., *Nature*, 315: 343-345, 1985), oveja (Hammer et al., *Nature*, 315: 343-345, 1985), bovino, ratón o primate. Ver también, por ejemplo, Church, 1987, *Trends in Biotech.* 5: 13-19; Clark et al., 1987, *Trends in Biotech.* 5: 20-24; y DePamphillis et al., 1988, *BioTechniques*, 6: 662-680. Además, por ejemplo, la producción de ratas y ratones transgénicos a la orden, está comercialmente disponible.

En un aspecto de la presente invención, un ADN recombinante o transgen~~o~~, que comprende un promotor operablemente ligado a una secuencia de ADN que codifica para un péptido A $\beta$ , puede ser introducido a una rata para formar una rata transgénica que lleva en sus células el ADN recombinante. El ADN recombinante puede estar presente en, ya sea, la línea germinal o las células somáticas, o en ambas. El promotor, por ejemplo, NF-L y la secuencia que codifica A $\beta$  son, preferiblemente de la rata. Cualquier rata conocida puede ser usada como huésped para el transgen~~o~~ o para el ADN recombinante. Por ejemplo, el huésped puede ser una raza pura, por ejemplo, FVB/N o puede ser una raza mestiza.

Otro aspecto de la presente invención es también el desarrollo de un mamífero transgénico, que se reproduce a sí mismo, por ejemplo, uno en el cual la línea germinal del mamífero transgénico se transforma establemente con el ADN recombinante, de acuerdo a la presente invención, permitiendo su transmisión a las generaciones subsiguientes.

Un aspecto adicional de la invención es la expresión del péptido A $\beta$  en el mamífero transgénico. La ocurrencia de depósitos amiloideos que comprenden al péptido A $\beta$ , son un rasgo característico de la enfermedad de Alzheimer (AD) y es una faceta de la neuropatología de la enfermedad. La deposición de A $\beta$ , o amiloidosis, se observa también en otras enfermedades, incluyendo el síndrome de Down y la hemorragia cerebral con amiloidosis del tipo Dutch (HCHWA-D). La expresión del péptido A $\beta$  en el mamífero transgénico, y su genotipo consecuente puede, por lo tanto, ser usado como modelo para tales enfermedades y patologías, por ejemplo, como un modelo de AD. Por ejemplo, los agentes activos, sintéticos, orgánicos, inorgánicos, o moléculas basadas en ácidos nucleicos, pueden ser administrados a un mamífero transgénico, de acuerdo a la presente invención, para identificar a los agentes que, ya sea, inhiben, previenen y/o reducen la aparición del péptido A $\beta$  en el cerebro, la patología de la AD, la neurodegeneración, la apoptosis, los déficit cognitivos y/o los síntomas conductuales, etc. Así, otro aspecto de la invención, es proveer un método para ayudar en el avance del tratamiento y/o prevención de los síntomas ya mencionados (por ejemplo, neurodegeneración o apoptosis) causada por el gen APP, o un fragmento de él.

Tal modelo de mamífero también puede ser usado para ensayar agentes, por ejemplo, zinc, y factores, por ejemplo, del entorno que exacerban y/o aceleran las enfermedades. Ver, por ejemplo, Bush et al., *Science* 265, 1464-1465, 1994.

Además, un mamífero que contiene un transgen de acuerdo a la presente invención, puede ser usado en un método para aislar un compuesto por su efecto en un fenotipo de un mamífero, preferiblemente una rata, en donde el fenotipo es conferido por el transgen. Por "fenotipo" se entiende, por ejemplo, una colección de rasgos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos



acumulación del péptido A $\beta$  en su cerebro. La acumulación puede ser en cualquier cantidad que sea mayor que la observada en mamíferos que no contienen el transgen~~x~~. Sin embargo, el fenotipo conferido por el transgen~~x~~ puede ocurrir antes o después que la acumulación pueda detectarse. La expresión y acumulación del péptido A $\beta$  en el cerebro del mamífero puede ser medida convencionalmente, por ejemplo, por inmunoensayo o hibridización nucleica, ya sea, in situ o desde ácido nucleico aislado de tejidos huéspedes. En los ejemplos que siguen, la expresión de A $\beta$  fue virtualmente indetectable en los controles, en secciones congeladas teñidas con anticuerpos, pero claramente visibles en mamíferos que tenían el transgen~~x~~ A $\beta$ . Ver, por ejemplo, la Figura 4.

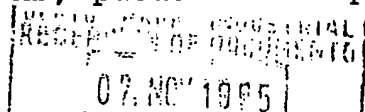
La identificación de agentes que previenen y/o tratan los síntomas asociados con la expresión del péptido A $\beta$  pueden ser determinados rutinariamente. Por ejemplo, un agente activo puede administrarse a un mamífero transgénico que expresa un ADN recombinante, de acuerdo a la presente invención, y entonces su efecto en la conducta o patología, por ejemplo, deposición de A $\beta$  en el cerebro, apoptosis y/o neurodegeneración, puede ser determinada. El agente puede administrarse agudamente (por ejemplo, una o dos veces) o crónicamente por cualquier ruta deseada, por ejemplo, subcutánea, intravenosa, transdérmica o intracatualmente. La formulación del agente es convencional, ver por ejemplo, *Remington Pharmaceutical Sciences*, 18a Ed., Mack Publishing Co., 1990. En una prueba, por ejemplo, un agente puede administrarse en diferentes dosis para separar grupos de mamíferos transgénicos, para establecer curvas de dosis-respuesta para seleccionar una cantidad efectiva del agente activo. Tal cantidad efectiva puede extrapolarse a otros mamíferos, incluyendo humanos.

RECEIVED  
JAN 11 1991  
FBI - NEW YORK

El mamífero transgénico, preferiblemente una rata, de acuerdo a la presente invención, por lo tanto, permite la prueba de una gran variedad de agentes y terapias. En la AD, por ejemplo, una cantidad de diferentes agentes se han identificado, los que afectan la disfunción cognitiva asociada con las enfermedades, por ejemplo, agentes colinérgicos, tales como los antagonistas de la muscarina, inhibidores de la acetilcolinesterasa, precursores de la acetilcolina, aminas biogénicas, nootrópicos y la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Además, los agentes que regulan la expresión de A $\beta$ , la deposición de A $\beta$  y los cambios fisiológicos asociados con la expresión de A $\beta$  y su deposición, también pueden identificarse, por ejemplo, la homeostasis de calcio, inflamación y haces neurofibrilares. Ver, por ejemplo, Pavia et al., *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, 25: 2129, 1989; John et al., *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, 28: 197-203, 1993. Adicionalmente, puede administrarse agentes activos que bloquean la apoptosis, por ejemplo, radicales libres carroñeros, tales como las glutationinas. Tales efectos en la AD pueden ensayarse en estudios, ya sea conductuales o fisiológicos y/o histológicos.

Por ejemplo, el aprendizaje espacial y las habilidades de memoria de las ratas pueden ser probadas en un laberinto de agua de Morris. Ver por ejemplo, Yamaguchi et al., *NeuroReport*, Vol. 2, 781-784 (1991). Adicionalmente, puede usarse otras pruebas de conducta, por ejemplo, el Test de Natación, Morris et al., *Learning and Motivation*, 12, 239-260, 1981; Open Field Test, Knardahl et al., *Behav. Neurol. Biol.* 27, 187-200, 1979; y pruebas y modelos usados rutinariamente, por ejemplo, en ratas, ratones y otros roedores.

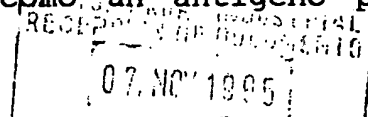
De acuerdo a la presente invención, las diferencias en, por ejemplo, niveles de expresión, localización celular y/o inicio de la expresión de A $\beta$ , puede usarse para mode-





lar la AD y otras enfermedades asociadas con la expresión de A $\beta$  y las diferentes etapas y progresiones de la enfermedad, por ejemplo, la degeneración celular, la muerte celular, la astrogliosis y/o amiloidosis. Puede lograrse, como se indica en los ejemplos que siguen, las cantidades, expresión temporal, y localización espacial de un péptido A $\beta$  transgénico en una rata. El tener un rango de fenotipos con expresión de péptido A $\beta$  puede ser útil para identificar las diferentes terapias y tratamientos con drogas y también para identificar ~~diagnosticalmente~~ el progreso de una enfermedad. Por ejemplo, los tratamientos específicos pueden depender de la región del cerebro en la que se expresa el péptido A $\beta$ , cuanto de él se expresa y la progresión temporal de la expresión. Así, mamíferos con diferentes fenotipos de péptido A $\beta$  pueden usarse como modelos para determinar terapias selectivas para las diferentes etapas de la enfermedad y para estudiar la progresión de ella y la intervención.

En otro aspecto de la invención, un ADN recombinante que comprende la secuencia que codifica para, substancialmente, el péptido A $\beta$  y células y/o mamíferos transformados con él, puede usarse como fuente de A $\beta$ , por ejemplo, como una fábrica de A $\beta$ . Por ejemplo, células, ver *ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, 7ª ed., 1992, pueden ser individualmente transformadas con el ADN recombinante y seleccionadas por expresión de A $\beta$ . Para métodos para transformar células de mamíferos, ver, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, Volumen 185, 1990, especialmente los capítulos 33-44; *Molecular Cloning*, Sambrook et al., 1989, especialmente, Libro 3, Capítulo 16; EP 0 451 700. El péptido A $\beta$  puede ser rutinariamente aislado de cultivos de células, por ejemplo, ver Masters C.L. et al., "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 :4245, 1985, y usadas, por ejemplo, como una herramienta de investigación, tal como un antígeno para crear



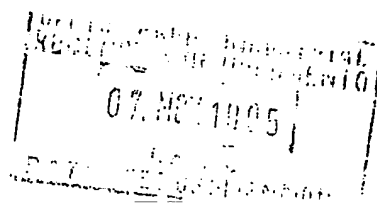
anticuerpos o para determinar propiedades físicas de A $\beta$ , para el diseño de terapias con drogas, en forma análoga a como serían usados los fragmentos de proteína- $\beta$  amiloidea, comercialmente disponibles y listadas en el *Sigma Chemical Company Catalog*, página 1119, 1994. Para tales propósitos, el péptido A $\beta$  puede aislarse de células o mamíferos transgénicos de acuerdo a medios convencionales, por ejemplo, removiendo tejidos en los que se expresa A $\beta$  y purificando el péptido por procedimientos rutinarios. Las células que expresan un ADN recombinante que comprende el péptido A $\beta$  pueden, también, usarse como modelo in vitro para estudiar la expresión y acumulación de A $\beta$ . Por ejemplo, puede administrarse agentes a los cultivos de células que comprenden células que expresan A $\beta$  y sus efectos pueden ser estudiados. Ver, por ejemplo, la Patente U.S. N° 5.087.571. Así, tales cultivos de células también pueden usarse como sistemas modelo.

La presente invención también se relaciona con métodos para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer, <sup>(AD)</sup> interfiriendo con la expresión del péptido A $\beta$  intracelular. Donde previamente se creyó que la secreción del péptido A $\beta$  de la célula y su correspondiente adherencia en placas extracelulares era responsable de la muerte característica de la célula, observada en pacientes con AD, se ha demostrado ahora que el A $\beta$  intracelular (A $\beta$  mientras está aún en la célula) puede gatillar la cascada fisiológica que conduce a la muerte de la célula neuronal, por ejemplo, la apoptosis y otros eventos deletreos asociados con la enfermedad. Esto indica un blanco prematuro para la intervención en la AD que tiene que ser aún identificado. Por ejemplo, estudios previos han concluido que la deposición extracelular de A $\beta$  era la causa primaria de la enfermedad, llevando a los investigadores a sugerir que interfiriendo con la formación de la placa sería suficiente para prevenir o tratar la enferme-

dad. De acuerdo a a este aspecto de la presente invención, mientras la formación de placa extracelular de A $\beta$  en el cerebro de pacientes afectados, puede ser deleterea para las células neuronales, no es el único fenotipo a evitar, para tratar adecuadamente la enfermedad. Además, la expresión de A $\beta$  dentro de la célula, sin formación de placa, puede ser un evento dañino. La disolución o prevención de la placa después de la producción de A $\beta$  puede no ser suficiente para lograr una intervención exitosa en la enfermedad, o una intervención óptima en ella.

Así, un aspecto de la presente invención es, inhibir o reducir la expresión del péptido A $\beta$  intracelular, por ejemplo, administrando a un paciente con enfermedad de Alzheimer, o un desorden relacionado, una cantidad de un compuesto efectivo para tal propósito. Típicamente, la cantidad de expresión de A $\beta$  inhibida o reducida, es menor que la cantidad que conducirá a la aparición de p53. Como se discute en el Ejemplo 9, el péptido A $\beta$  inicia la cascada que conduce a la apoptosis y a la muerte celular mediante la expresión de p53. Así, para disminuir o prevenir los síntomas asociados con la AD y enfermedades relacionadas, la expresión del péptido A $\beta$  puede reducirse a niveles en los cuales el gen~~x~~ p53 no se activa, o el gen~~x~~ p53 no se expresa, o la expresión no es suficiente para producir la apoptosis. Por "expresión", se entiende generalmente, cualquier evento que conduzca a la producción y/o acumulación de A $\beta$  intracelular o del péptido p53, por ejemplo, por transcripción del gen~~x~~, traducción del MRNA correspondiente, estabilidad o duración del producto del gen~~x~~ dentro de la célula.

Otro aspecto de la invención relacionado con este descubrimiento es el tratamiento o prevención de la AD mediante interferencia con la expresión del gen~~x~~ p53 o su producto. Se ha descubierto que la expresión de A $\beta$  intracelular puede inducir a p53, llevando a la apoptosis y a la liberación extra-



celular del péptido Aβ. Interfiriendo con, por ejemplo bloqueando o inhibiendo, la aparición del producto del gen~~x~~ p53, dentro de la célula, la AD puede ser tratada o prevenida.

La intervención de la expresión de APP o el gen~~x~~ p53 puede lograrse convencionalmente, por ejemplo, interfiriendo con la transcripción del gen~~x~~, la traducción del gen o la duración del producto del gen en la célula. Por ejemplo, los polinucléotidos anti-sentido o los inhibidores de ribozima pueden emplearse para inhibir la traducción de un mRNA codificando para un polipéptido. Ver por ejemplo, Yung W.K. *Curr. Opin. Neurol.*, 7 (6): 501 - 5 (1994). Los métodos para seleccionar una ribozima o un compuesto de ácido nucleico anti-sentido pueden ser determinados basado en la secuencia conocida de APP o p53 mRNA y probadas in vitro para su efecto en la traducción.

[REFERENCIA] El compuesto de ácido nucleico puede ser administrado convencionalmente, por ejemplo, proveyéndolo como una composición farmacéutica administrada oral, intravenosa, intracatecalmente, mediante inoculación estereotáctica dentro del cerebro, etc, en una cantidad efectiva para inhibir la traducción del gen~~x~~. Para aumentar la estabilidad u otras características del compuesto útil cuando se administra a un paciente, los nucleótidos derivados pueden substituirse por las bases que ocurren naturalmente.

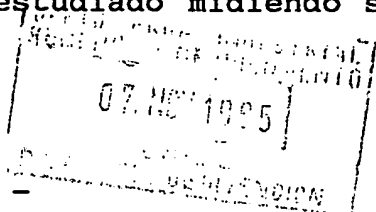
Una ribozima o compuesto anti-sentido también puede introducirse dentro del cerebro por un vector genético. Por ejemplo, un vector retroviral o adenovirus puede emplearse para transferir un gen~~x~~ que codifica a una ribozima u oligonucleótido dentro de un paciente. Ver, por ejemplo, M.G. Kaplitt et al., *Nat. Genet.* 8 (2): 148 - 54 (1994); Horellou et al., *Neuroreport (INGLATERRA)* 6 (1): 49 - 53 (1994); G. Le Gal La Salle et al., *Science* 259: 988 - 90 (1993); S. Chatterjee et al., *Science* 258: 1485 - 8 (1992); M. Yamada et al., *Jpn. J.*

07. NOV 1995

Cancer Res. 83: 1244 - 7 (1992); Y. Takahara et al., *J. Virol.* 66: 3725 - 32 (1992). Los vectores de virus Herpes simplex 1 también pueden usarse para modificar la fisiología neuronal in vivo, por ejemplo, por la introducción de un ~~gene~~ que codifica para un anti-sentido o ribozima, u otros elementos genéticos que pueden usarse para interferir con la expresión de APP o el ~~gene~~ p53. Ver, por ejemplo, L. Sorocenu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (5), 1411 - 5 (1995); D. S. Latchman, *Mol. Biotechnol.* 2 (2) 179 - 95 (1994); H.J. Federoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1636 - 40 (1992); A.I. Geller, *J. Neurosci. Methods* 36: 91 - 103 (1991). Los compuestos también pueden administrarse por liposomas o implantando células que expresan el compuesto deseado dentro del cerebro. Ver, por ejemplo, E.Y. Snyder et al., *Nature* 374 (6520): 367 - 70 (1995).

La intervención de la expresión de APP o el ~~gene~~ p53 también puede lograrse manipulando los procesos celulares responsables del procesamiento del producto del gen, tal como la partición de la proteína precursora, regulando los enzimas correspondientes o desacoplando la señal del péptido AB de la expresión de p53. Tales agentes útiles incluyen por ejemplo, anti-oxidantes, y pueden ser administrados rutinariamente. La dosis efectiva de droga puede determinarse desde el modelo animal, de acuerdo a la presente invención.

En una faceta relacionada, la detección de la actividad del ~~gene~~ p53, por ejemplo, detectando su mRNA, producto protéico, o anticuerpos de él, puede ser usada para diagnosticar o evaluar la progresión de la enfermedad. La última puede ser especialmente útil en el modelo rata para determinar la eficacia de diferentes drogas en el tratamiento o prevención de la AD y desórdenes relacionados. Así, un efecto de un compuesto, por ejemplo, un oligonucleótido anti-sentido, en el fenotipo de la rata enferma de AD puede ser estudiado midiendo su habilidad



para reducir o alterar los niveles neuronales de p53. La presente invención por lo tanto se relaciona con un método para identificar compuestos para prevenir o tratar la AD que comprende la administración de un compuesto a un animal transgénico de acuerdo a la presente invención y midiendo la cantidad de p53 neuronal. EL p53 puede cuantificarse in vivo o in vitro, por ejemplo, sacrificando al animal, removiendo el cerebro y detectando el p53 mRNA o la proteína en secciones de tejido u homogeneizados de acuerdo a procedimientos estándar, por ejemplo, hibridación in situ, análisis Northern, PCR.

Las manipulaciones de DNA, RNA y otros ácidos nucleicos pueden efectuarse rutinariamente, por ejemplo, como se describe en Molecular Cloning, Sambrook et al., 1989.

Sin elaboración adicional, se cree que una persona entrenada en el arte puede, usando la descripción precedente, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las siguientes modalidades preferidas son, por lo tanto, consideradas como meramente ilustrativas y no limitantes del resto de la descripción de ninguna manera.

En los anteriores y siguientes ejemplos, todas las temperaturas están expresadas en grados Celsius; y a menos que se indique de otra manera, todas las partes y porcentajes están dadas por peso.

Todas las revelaciones de todas las solicitudes, patentes y publicaciones citadas, antes o después, son por lo tanto incorporadas por referencia. La publicación "The Alzheimer's AB Peptide Induces Neurodegeneration and Apoptotic Cell Death in Transgenic Mice", *Nature Genetics* 9, pp. 21 - 30 (1995). y el manuscrito titulado, " Extracellular Deposition of  $\beta$ -amyloid Upon p53-dependent Neuronal Cell Death in Transgenic Mouse," por Frank M. LaFerla, Catherine A. Kappel Hall, Lien

Ngo, y Gilbert Jay, también se incorpora por referencia y se agrega aquí.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Varios otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán mejor apreciadas a medida que sean mejor entendidas, cuando se consideren junto con los dibujos que se acompañan, en los cuales la misma referencia de carácter designa a los mismos, o partes similares a través de las distintas vistas y en donde:

La Figura 1, es una representación esquemática del fragmento de restricción *Hind* III-*Sac* I usado para generar ratas transgénicas . La secuencia que codifica al péptido A $\beta$  se generó por reacción en cadena reversa de transcriptasa - polimerasa usando RNA de cerebro de rata, debido a que producirá un péptido idéntico al de la rata. El iniciador delantero contenía un codón de iniciación de una ATG, flanqueado por una secuencia consensual de Kozak (61) (no hay otros sitios hacia arriba de ATG con esta construcción transcripcional) mientras el iniciador reverso contenía un codón de terminación en-marco TAA. El fragmento PCR de 151-bp se clonó dentro de los sitios *Bam*HI y *Sac*II del vector pBluescript-KSII (Stratagene), y fue subsecuentemente confirmado por análisis secuencial. La secuencia SV-40 de señal de poliadenilación se aisló por digestión *Bam*HI y *Bcl*II (62); los ligadores *Sac*II se ligaron a este fragmento el que fue clonado después de la región A $\beta$ . El promotor de rata NF-L (63) se clonó dentro de los sitios *Hind*III y *Bam*HI. El fragmento de 2,2-kb *Hind*III y *Sac*I se usó para la generación de mamíferos transgénicos.

La Figura 2, es una caracterización del mRNA de A $\beta$  en ratas transgénicas. Las pistas 1 y 2 contienen 10  $\mu$ g de RNA

de los cerebros de ratas no-transgénicas de 4 semanas y ratas G2 transgénicas, respectivamente. La banda de alto peso molecular en ambas pistas 1 y 2, corresponde a las transcripciones de APP endógeno. En la pista 2, la banda inferior (indicada por la flecha) tiene aproximadamente 600 nucleótidos (nt) de largo y representa la transcripción del ADN recombinante. La posición del RNA ribosomal 28S y 18S están indicadas por las puntas de flechas.

La Figura 3, muestra la detección de mRNA de A $\beta$  transgénico en el cerebro, por hibridización in situ. Vista en campo oscuro de la emulsión de auto-radiogramas de secciones coronales de cerebros de ratas no-transgénicas de 6 meses de edad (a) y transgénicas (G2) (b). Una sonda oligonucleótido anti-sentido marcada con S<sup>35</sup> que reconocía las regiones de A $\beta$  y SV40 de la transcripción transgénica se usó para esas hibridizaciones in situ. CA, cuerno de Amón; CX, cortex cerebral; DG, giro dentado; HC, hipocampo.

La Figura 4, muestra la detección de la inmunoreactividad de A $\beta$  en los cerebros de ratas transgénicas (G2). Las crio-secciones de cerebro del testigo y mamíferos transgénicos están a los lados izquierdo y derecho, respectivamente. Las regiones de cerebros representadas incluyen el hipocampo (a, b) y el neocortex cerebral (c, d). Las flechas muestran inmunoreactividad extracelular aparente de A $\beta$ . Estas secciones fueron inmunoteñidas con el anticuerpo anti-A $\beta$  de Boehringer Mannheim. Aumentos originales: a, b= 25 X; c, d= 50 X. CA, cuerno de Amón ; DG, giro dentado.

La Figura 5, muestra la incidencia de muerte en ratas transgénicas NF $\kappa$ -A $\beta$ . Las barras sólidas y hachuradas reflejan las tasas de muerte para el testigo y las ratas transgénicas, respectivamente. Los valores de significación se calcula-

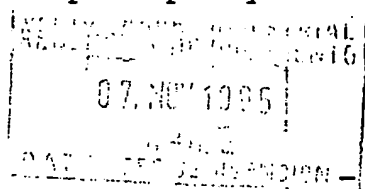


ron por medio del análisis de Chi Cuadrado (Maentel - Haenzel) y están indicadas sobre cada punto de tiempo.

La Figura 6, muestra alteraciones en la morfología de células neuronales en los cerebros de ratas transgénicas. Se muestra micro-fotografías con alta magnificación de secciones sagitales teñidas con hematoxilina - y - eosina del neocortex (a, b), hipocampo (c, d) y tálamo (e, f). Las ratas testigos y los hermanos-de-camada transgénicos (10 meses de edad) están a los lados izquierdo y derecho, respectivamente. En c y d, el tracto superior de células son del giro dentado mientras que el inferior son de la región CA3. Magnificación original = 50 X.

La Figura 7, muestra la detección bioquímica y morfológica de células apoptóticas en cerebros transgénicos. Cortex cerebral de un mamífero testigo en el cual son evidentes las células no-TUNEL positivas (a). Neocortex transgénico de G2 (b) y líneas J3 (c) teñidas con TUNEL mostrando apoptosis extensiva. Secciones seriadas de neocortex J3 teñidas con, ya sea, hematoxilina- y -eosina (d) o GFAP (e). Un hipocampo testigo de un mamífero normal en el cual no hay evidencias de células TUNEL-positivas (f). El hipocampo (g) y la amígdala (h) de mamíferos de la línea G2 con teñido TUNEL extensivo. Secciones seriadas del tálamo de un mamífero transgénico G2 teñido con TUNEL (i) o H&E (j), proveyendo evidencia bioquímica y morfológica de apoptosis. Las flechas en i apuntan a células con teñido TUNEL perinuclear, mientras que en j, apuntan a células condensadas, apoptóticas; las puntas de flecha apuntan a núcleos fragmentados (i, j). Las magnificaciones originales: a-e = 50 X; f-j = 25 X.

La Figura 8 muestra astrogliosis en los cerebros de ratas transgénicas. Microfotografías de baja magnificación de secciones sagitales de cerebro inmuno teñidas - GFAP, mostrando las regiones hipocampal y cortical de una rata testigo de 6 me-



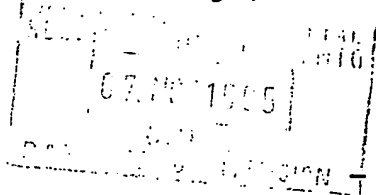
ses (a) y su hermana-de-camada (b), magnificaciones originales = 10 X. Se muestra microfotografías de alta magnificación del neocortex de una rata testigo (c) y una rata transgénica de las líneas G2, J3, J4 (d - f), magnificaciones originales = 50 X. CA, cuerno de Amón; CX, cortex cerebral; DG, giro dentado; GL, limitantes gliales.

La Figura 9, muestra las secuencias de aminoácidos humano (A), murino (B), y HCHWA-D (C) de péptidos A $\beta$ . Los aminoácidos están representados por los símbolos convencionales de una letra. Un guión indica que el aminoácido es el mismo que en la secuencia humana.

### EJEMPLOS

#### Ejemplo 1: Construcción de ADN que Comprende un Péptido A $\beta$

Un homólogo de un péptido A $\beta$  humano se seleccionó para interactuar con factores celulares específicos-para especies, para potenciar su toxicidad. Los péptidos A $\beta$  humanos y murinos estaban altamente conservados, y, como su contraparte humana, el péptido murino poseía la habilidad de formar fibrillas in vitro y es tan amiloidogénico como la secuencia humana (28, 29). Para restringir la expresión de la región codificadora de A $\beta$  a las células neuronales, se seleccionó 1,8-kb de DNA 5' flanqueador del gen neurofilamentoso - ligero de rata (Figura 1); el gen *NF-L* es transcripcionalmente activo durante toda la vida adulta (30). Para permitir la traducción de la transcripción quimérica, un codón de iniciación de metionina y una secuencia de Kozak se colocaron inmediatamente delante de la secuencia codificadora A $\beta$ . La secuencia de poliadenilación se derivó de la digestión de ADN SV40 con BamHI/BclI. Hay dos señales poliA en este fragmento con orientaciones opuestas; se usó la señal temprana poliA del gene T-Ag (por ejemplo, 5'BclI/-BamHI 3'). Sin embargo, se ha encontrado (*Mol. Cell. Biol.* 9,



4248 - 4258) que la señal polIA puede ser utilizada si se inserta en la orientación tardía, por ejemplo, 5' BamHI-BclI 3'; así, este fragmento también puede ser utilizado. Para el promotor, el sitio Hind III es un sitio que ocurre naturalmente al final - 5' del promotor, y el BamHI fue fabricado (*J. Cell. Biol.* 108, 579 - 593, (1989). Después de procesar en la célula para remover la metionina, se generó un auténtico péptido A $\beta$  de 42 aminoácidos.

## Ejemplo 2

El ADN recombinante quimérico NF<sub>L</sub>-A $\beta$  de 2,2 - kb se microinyectó en embriones de una sola célula FVB/N (31-34). Los mamíferos fundadores se retro-cruzaron con la raza parental FVB/N (Taconic, 273 Hover Avenue, Germantown, NY 12526) para establecer líneas independientes. Los mamíferos transgénicos iniciales se identificaron por hibridización Southern blot. Se extrajo el ADN de cola, se digirió con la enzima de restricción BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. El ADN se transfirió entonces a nitrocelulosa y se sondeó con fragmentos de ADN que incluyen la porción 3' de el promotor de neurofilamento, a través de la secuencia codificadora de A $\beta$ .

Para determinar si la expresión del ADN recombinante había sido dirigida al cerebro, se preparó RNA total de un mamífero F<sub>1</sub> de las varias líneas y se analizó para la reacción en cadena reversa de transcriptasa-polimerasa (RT-PCR). En este análisis semi-cuantitativo, 6 u 8 líneas transgénicas se identificaron como positivas para la expresión de RNA. Para determinar si fue generado el tamaño apropiado del transcripto y para determinar los niveles relativos de expresión entre las líneas transgénicas se efectuó la hibridización Northern blot (Figura 2). Una línea (G2) expresó al ADN recombinante a un

nivel significativamente más alto que las otras líneas. La transcripción transgénica se predijo que sería de 500-600 nucleótidos (nt) de largo, dependiendo del largo del tracto poli-A; esto incluye 111 nt de secuencia no codificadora 5', 129 nt de la región codificadora y otros 175 nt de la secuencia no codificadora 3'. La sonda usada para el análisis Northern, además de detectar la transcripción transgénica, también detectó la transcripción de APP endógeno, proveyendo una referencia interna a la cual el nivel de estado-constante del ADN mRNA recombinante podría ser comparado. La hibridización a una banda de aproximadamente 600 nt, el tamaño esperado de la transcripción transgénica, se ve sólo en la pista 2, la cual contiene RNA cerebral de una rata transgénica de la línea G2. Como se esperaba, la sonda también detectó una banda de aproximadamente 3,2-kb de largo, el tamaño reportado de las transcripciones de APP endógeno (5-7), que también está presente en la pista que contiene RNA de un cerebro no-transgénico. Una comparación de los niveles de transcripción transgénica con la transcripción endógena, claramente revela un nivel más alto de estado constante, substancialmente más alto que el anterior (Figura 2). Esta diferencia es aún más dramática, cuando uno considera que el mRNA transgénico codificará exclusivamente al péptido A $\beta$ , mientras en el mejor de los casos, sólo una fracción de las moléculas traducidas del mRNA de APP endógeno producirán A $\beta$ . Basado en estos análisis de RNA, se seleccionaron para análisis posterior, tres líneas que lo expresaban independientemente (G2, J3 y J4).

### Ejemplo 3

Para localizar precisamente aquellas áreas del cerebro que expresaban el ADN recombinante, se efectuaron análisis de hibridización in situ.

Condiciones in situ: secciones de tejido cerebral montadas en parafina en porta-objetos cubiertos de silano se desparafinizaron en xileno, se re-hidrataron a través de series de etanol, y se trataron con proteinasa K (1µm/ml) por 10 minutos. Esto fue seguido por un tratamiento con dos mg/ml de glicina en PBS por 30 segundos, un enjuague en PBS, y una post-fijación en paraformaldehído al 4% en PBS por 5 minutos. Las secciones fueron secadas al aire e hibridizadas con  $\approx 4 \times 10^6$  cpm/50 µl/preparación de la sonda con cola. EL tampón de hibridización consistía de formamida al 50%, 0,6 M de NaCl, 0,05 M Tris, 7,4, 0,04 M EDTA, 0,1% pirofosfato de sodio, 0,2% SDS, 10% de sulfato de dextrán, 0,2% heparina sódica, y 0,1 M DTT. Después de incubarlos durante la noche a 37°C, las preparaciones se enjuagaron en 1 x SSC por 10 minutos (dos veces), se lavaron una vez por 10 segundos en agua, se sumergieron en etanol de 70% y se secaron al aire y se expusieron a la película.

Sonda de oligonucleótidos para hibridización in situ:

sonda de unión AB/SV40,

5'GTGGTATGGCTGATTATGATCCGCGGTTATGCTATGACAACGCCACC3';

sonda SV40 sólo,

5'TATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGG3'.

Secciones coronales de cerebro de mamíferos transgénicos y sus hermanos-de-camada no-transgénicos se hibridizaron con una sonda de oligonucleótidos homóloga a la de unión entre la secuencia AB y la SV40 presente en ADN recombinante. Se observó una fuerte señal de hibridización en regiones específicas de los cerebros de ratas transgénicas (Figura 3b). La expresión del ADN recombinante fue fácilmente detectada en el cortex cerebral y en el hipocampo, regiones que están significativamente comprometidas en la enfermedad de Alzheimer. Estos resultados también fueron confirmados por hibridización a sec-

ciones sagitales del cerebro. Otras regiones del cerebro transgénico, incluyendo el tálamo y el cerebelo, expresaron al ADN recombinante en un grado menor. Esta misma sonda no se hibridizó significativamente a una sección del cerebro de una rata testigo (Figura 3a), aunque se detectó una señal de hibridización débil en la región hipocampal, la cual similarmente refleja hibridización de fondo a un App endógeno, desde que una sonda homóloga solamente a la secuencia SV40, en la región no-codificadora 3' del ADN recombinante, no se hibridizó. Además, el patrón de hibridización observado con la sonda SV40, en secciones de mamíferos transgénicos, fue similar a la observada con la sonda de unión (datos no mostrados). Mientras estos estudios claramente revelan que el ADN recombinante es expresado en células neuronales, no podemos excluir la posibilidad de que la expresión pueda también ocurrir en otros tipos de células.

Para determinar donde el péptido A $\beta$  estaba acumulándose en el cerebro, crio-secciones de ratas transgénicas y testigos de igual edad fueron inmuno teñidas con anticuerpos A $\beta$ -específicos. Los anticuerpos usados incluyeron los N° 1 381 431; del catálogo Boehringer Mannheim; antisuero policlonal de conejo (472, 473) preparado convencionalmente; y anticuerpo 4G8, comprado a H. Wisniewski (SUNY Brooklyn, New York). El anticuerpo de GFAP fue comprado a Dakopatts (Catálogo N° Z 334). No se detectó inmuno teñido en tejidos cerebrales, ni en las transgénicas ni en los testigos, cuando se usó suero pre-inmune (datos no mostrados). Secciones cerebrales no transgénicas también fallaron para inmuno teñirse apreciablemente con cualquiera de los anticuerpos A $\beta$  probados, mientras que se detectó inmunoreactividad en los cerebros de ratas transgénicas.

La Figura 4, compara la distribución regional de la inmunoreactividad para el péptido A $\beta$  en las regiones hipocampal y cortical de ratas testigos y transgénicas. Mientras la

inmunoreactividad A $\beta$  significativa no fue evidente en el hipocampo del testigo (Figura 4a), el inmuno teñido fue detectable en células del cuerno de Amón (células CA) así como en células del giro dentado de un mamífero transgénico (Figura 4b). Nótese que muchas células en el giro dentado son inmunoreactivas mientras solo grupos de células en las regiones CA eran inmuno teñidas en este mamífero, lo que sugirió que el teñido con anticuerpo es específico para células que acumulan al péptido A $\beta$ . Focis ocasionales de inmunoreactividad, encontrados en áreas hipocámpales de baja densidad celular, pueden representar depósitos extracelulares o dendríticos de A $\beta$  (Figura 4b). Otra región del cerebro transgénico que mostró inmunoreactividad A $\beta$  extensiva fue el cortex cerebral. La acumulación de A $\beta$  fue observada en neuronas a través del cortex (Figura 4d), mientras una región similar de un hermano-de-camada no transgénico no mostró ninguna inmunoreactividad (Figura 4c). Otras regiones que mostraron inmunoreactividad A $\beta$  incluían el tálamo y cerebelo, y de nuevo, aquellas regiones en el cerebro del testigo no revelaban ninguna inmunoreactividad (datos no mostrados). Interesantemente, en cada sección transgénica, algunas células mostraban inmuno teñido prominente mientras otras células en la vecindad no se teñían. Esto sugiere que es poco probable que el anticuerpo se ligue no-específicamente a diferentes regiones cerebrales. Además, la expresión no es amplia en todas las regiones; en algunas áreas, la expresión aparece más alta y compromete una mayoría de células, mientras sólo áreas focales de células en otras regiones aparecen inmunoreactivas. Así, hay un buen traslape entre el mNRA de A $\beta$  y la expresión del péptido en los cerebros de mamíferos transgénicos.

Ejemplo 4: Fenotipo conductual, resultados de la expresión A $\beta$  en la degeneración de células neuronales

Observaciones iniciales de mamíferos transgénicos de la generación  $F_1$  revelaron varios casos de muerte prematura inexplicada. Para analizar la incidencia de muerte, una población de 76 ratas transgénicas y 43 hermanos-de-camada no transgénicos se estudiaron. Las tasas de mortalidad se calcularon basadas en el número de ratas que murieron, relacionada con el número de las que sobrevivieron dentro de un intervalo de tiempo especificado. Estos valores se ilustran en la Figura 5. Una diferencia estadísticamente significativa entre las tasas de mortalidad de las ratas transgénicas y no transgénicas fue aparente a los 6 meses de edad ( $P < 0,05$ ). Esta diferencia se hizo aún más dramática a los 12 meses, cuando más del 50% de las ratas transgénicas habían muerto ( $P < 0,0001$ ). Desde que las ratas testigo FVB usualmente viven aproximadamente 24 meses, la expresión del ADN recombinante puede progresivamente dañar funciones neurológicas vitales y resultar en mortalidad prematura. Mientras los pacientes de AD pueden vivir por muchos años con esta aflicción, el daño progresivo en el cerebro eventualmente conduce a la muerte en la edad mediana o tardía de la vida (35, 36).

La evidencia conductual de anormalidades neurológicas, en forma de ataques, se observó en varias de las ratas transgénicas. Estos eventos generalmente persistían durante 10-30 segundos, durante los cuales las ratas estiraban las cuatro extremidades, abrían sus hocicos, flexionaban sus colas hasta que quedaban rígidas y se estremecían violentamente. Después del episodio, las ratas parecían experimentar un breve período de letargia. Dada la breve duración de esos ataques, es probable que una gran proporción de las ratas transgénicas puedan haber tenido esa conducta. Además, la actividad de los ataques puede haber sido gatillada por disrupción de recorridos neurológicos específicos. Desde que no todas las ratas se afectaron en el mismo grado en cada región del cerebro, uno no puede esperar



que todos los mamíferos reaccionen igual. Los ataques no se manifestaron en ninguno de los hermanos-de-camada testigos. Notablemente, la ocurrencia de los ataques se ha observado también en pacientes con AD, en donde parece un rasgo frecuente en los últimos estados de la enfermedad (37-39).

Los mamíferos transgénicos que murieron prematuramente se sometieron a autopsia para determinar la causa de muerte. El examen anatómico así como el histológico macro de los órganos viscerales no reveló ningún cambio patológico que pudiera justificar sus muertes. Sin embargo, en ~~virtualmente~~ cada mamífero, ciertas regiones del cerebro contenían células morfológicamente alteradas. Para confirmar estas alteraciones, se anestesió ratas transgénicas y testigos, de la misma edad, se perfundieron intracardialmente e inmediatamente se procesaron para análisis histológico. En las ratas transgénicas analizadas, se observó zonas agudamente demarcadas de citoplasma perinuclear de las células neuronales, en diferentes regiones del cerebro incluyendo el cortex cerebral, hipocampo, tálamo y, ocasionalmente el cerebelo. En esas regiones, las células afectadas se encontraban frecuentemente en la vecindad inmediata de células no-afectadas, sugiriendo que los cambios observados no eran causados por fijación inadecuada. Otra indicación que la distinta zona perinuclear observada en las neuronas de ratas transgénicas no se debía a encogimiento del tejido fue la aparición de los espacios perivasculares Virchow-Robin, que eran igualmente visibles en ambas, testigos y transgénicas, sometidas a fijación por perfusión vascular.

La Figura 6a muestra el neocortex de una rata perfundida no-transgénica en donde la pericarya aparece normal. En contraste, muchas células en el cortex de las transgénicas aparece morfológicamente alterado, como lo indica las zonas perinucleares de citoplasma no-teñido. Esas células alteradas

estaban, típicamente, confinadas a regiones focales dentro del cortex cerebral, pero pueden ser bastante extensivas (Figura 6b). El hipocampo era otra región que contenía, frecuentemente, células morfológicamente alteradas. Mientras la estructura general del hipocampo no había cambiado, nótese que las células neuronales con citoplasma no-teñido son fácilmente reconocibles dentro de la región CA3 y dentro del giro dentado (Figura 6d). En contraste, esos cambios no se presentaban en los mamíferos testigo (Figura 6c).

Ejemplo 5: La neurodegeneración es seguida de muerte apoptótica de la célula

El examen de las secciones histológicas reveló que la cromatina nuclear en algunas células se condensaba y terminaba en la membrana nuclear, un rasgo morfológicamente distintivo de la apoptosis (40). Un sello bioquímico de las células que sufren apoptosis es la división internucleosomal del ADN (40) que se visualiza por electroforesis de gel. Desafortunadamente, este método es un ensayo promediable y es <sup>insensible</sup> ~~insensitive~~ comparado con ensayos como TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling) que permite la detección de células que están muriendo in situ, antes que el ADN sea extensivamente fragmentado. Además, TUNEL facilita la determinación del número real de células que está sufriendo apoptosis, permite la comparación de la extensión de compromiso entre regiones afectadas y permite aún, la detección de una célula única afectada entre un fondo de células normales.

Un estudio de 28 mamíferos transgénicos, que representaban tres líneas independientes, reveló la presencia de células apoptóticas en los cerebros de 14 de esos animales. Aunque las áreas apoptóticas pueden ser muy extensas en algunos mamíferos, ellas eran, generalmente focales; de aquí, es posible que aún más mamíferos contuvieran células apoptóticas, ya que TUNEL fue efectuado en secciones al azar del cerebro de cada mamífero. Además, esos sitios de células apoptóticas se observaron más frecuentemente en ciertas regiones del cerebro, implicando que algunas áreas eran más susceptibles que otras. El cortex cerebral fue una de las regiones más frecuentemente comprometidas, y se muestra ejemplos de mamíferos representativos de las líneas G2 y J3 (Figuras 7b, c). Nótese que las células TUNEL positivas están esparradas en las capas más periféricas del cortex; sin embargo, ocasionalmente se observó células apop-

tóticas en regiones más profundas del cortex. También observamos que algunos de los núcleos se teñían diferencialmente con TUNEL; como los núcleos no estaban en algunas de esas células, esto sugiere que ellas podrían haber estado en distintas etapas del proceso apoptótico (Figura 7c). En contraste, las células TUNEL positivas no se observaron en los hermanos-de-camada negativos (Figura 7a). Además, células con zonas perinucleares de citoplasma no-teñido (Figura 7d) se encontraron frecuentemente en proximidad cercana de células intensamente teñidas con TUNEL (Figura 7c), implicando que las células degenerantes morirían, eventualmente por apoptosis.

El hipocampo fue otra de las regiones que frecuentemente contenía teñido TUNEL resaltante en los mamíferos transgénicos. Mientras en algunos mamíferos, zonas de células dentro de las regiones CA1 y CA3 contenían teñido TUNEL prominente (Figura 7g), en otros, también se observó células marcadas con TUNEL en la región CA2 y en el giro dentado. No se observó células TUNEL positivas en el hipocampo de los testigos (Figura 7f). Otra región prominente que contenía células apoptóticas fue la amígdala (Figura 7h). En la amígdala, como era el caso del cortex cerebral e hipocampo, se encontró células apoptóticas en yuxtaposición estrecha con células no teñidas, demostrando la especificidad de TUNEL. Es interesante que esas tres regiones cerebrales que contenían células apoptóticas, están entre las regiones más comprometidas de los cerebros de pacientes de AD (2).

Morfológicamente, bajo microscopio óptico, las células experimentando apoptosis se caracterizan por un encogimiento y condensación de la cromatina nuclear, inicialmente en manchas densas alrededor de la membrana nuclear, después en masas en forma de media luna y, finalmente en esferas densas (42). Aunque TUNEL permite la detección más temprana de las células

apoptóticas que el criterio morfológico sólo (41), las células eran reconocibles en preparaciones histológicas. Como se esperaba, el examen histológico de las secciones cerebrales indicó, que áreas con células TUNEL positivas también contenían células con rasgos morfológicamente distintivos de apoptosis, incluyendo la presencia de núcleos compactados y fragmentados (cf. Figuras 7i, j). Por lo tanto, las células apoptóticas podían ser claramente distinguidas en los cerebros de ratas transgénicas por ambos criterios, morfológicos y bioquímicos.

Interesantemente, las regiones cerebrales en las que se observó apoptosis extensiva, como lo indicaba TUNEL y la presencia de núcleos fragmentados, también aparecieron hipocelulares y se observó que la neuropila circundante también asumía un cambio secundario, adaptando una apariencia algo "esponjada". Estas islas de tejido "esponjoso" se encontraron dentro de regiones de degeneración neuronal extensiva (cf. Figuras 7i, j). En humanos con AD se ha descrito un cambio similar en el tejido cerebral circundante (43). Como se ha especulado que la apoptosis está envuelta en desórdenes neurodegenerativos (44), estos resultados son importantes, no sólo porque proporcionan evidencia directa de la pérdida de células debida a la expresión de A $\beta$  in vivo, sino que sugieren que el mecanismo subyacente responsable de la muerte celular en pacientes de AD, envuelve la apoptosis. Interesantemente, se ha mostrado que A $\beta$  induce la apoptosis en neuronas cultivadas (45).

#### Ejemplo 6: La gliosis reactiva acompaña a la degeneración y apoptosis

Desde que la expresión de A $\beta$  induce neurodegeneración y apoptosis en los cerebros de ratas transgénicas, esto sugiere que también debe haber desórdenes funcionales. Una respuesta prominente a muchos tipos de daños o desafíos al CNS es

la activación de los astrocitos, un proceso denominado gliosis (46); este proceso reactivo se observa también en cerebros con AD (47,49). Consecuentemente, tejidos cerebrales de ratas transgénicas y testigos de la misma edad se inmunoensayaron para determinar la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) un filamento intermedio específico del astrocito (50).

En el cerebro testigo, la inmunorreactividad se localizó principalmente en la región del hipocampo y en la capa del limitante glial del cortex cerebral (Figura 8a), de acuerdo con la distribución informada de las células que expresan GFAP (51). En contraste, las secciones cerebrales de ratas transgénicas mostraron un inmunoteñido <sup>muy</sup> ~~grandemente~~ aumentado (Figura 8b). Además, en los cerebros transgénicos de cada línea independiente, la extensión de la inmunoreactividad varió; en algunos mamíferos, la gliosis fue focal, pero en otros fue más extensa y dispersa. Por ejemplo, en la línea G2, la gliosis extensiva estaba presente a través de las capas corticales (Figura 8d), una región en la que los astrocitos GFAP-positivos no son evidentes en mamíferos normales (Figura 8c). En las líneas J3 y J4, las áreas glióticas eran menos dispersas y pueden estar menos restringidas a, ya sea, las capas corticales, superficiales o profundas (Figuras 8e, f, respectivamente). La diferencia en la extensión de la gliosis puede deberse al menor nivel de expresión del ADN recombinante en las líneas J3 y J4. Además, los astrocitos de los cerebros transgénicos estaban agrandados, con números de proceso más gruesos y aumentados, rasgos todos de astrocitos reactivos (46). Estos hallazgos sugieren que la astrogliosis ha sido una respuesta, junto con los cambios neuronales observados en cerebros transgénicos. La astrogliosis se observó en, al menos, 15 de 20 mamíferos transgénicos examinados de más de seis meses de edad.

Los astrocitos reactivos se encuentran frecuentemente en áreas que contienen células degenerativas, ya sea con o sin células que están progresando a la apoptosis (cf. Figuras 7c, e). Esto fue cierto, no sólo en el cortex cerebral, sino en otras regiones, incluyendo la amígdala y el hipocampo (datos no mostrados). Sin embargo, las regiones que aparecieron hipocelulares y esponjosas, a menudo, eran no-glióticas, sugiriendo que una vez que las células habían muerto, los astrocitos no estaban presentes.

El desarrollo de la astrogliosis en las ratas transgénicas provee mayor evidencia de anormalidades neurológicas. Los astrocitos juegan un rol importante en el CNS al responder al daño. Claramente, si el ADN recombinante NF<sub>L</sub>-AB estuviera provocando la degeneración neuronal o el daño, el desarrollo de la gliosis sería una respuesta constante y esperada. En el cerebro AD, se ha demostrado también que la gliosis diseminada ha sido también un rasgo resaltante y frecuente (47-49). Curiosamente, en algunas ratas transgénicas, se notó la presencia de gliosis, en las cuales se notó sólo cambios neuronales menores. Esto sugiere que mientras los cambios en la morfología neuronal son un rasgo común en tales ratas, no son la única forma de daño neuronal que elicitará el compromiso de los astrocitos. Además, es concebible que los astrocitos pueden jugar un rol que contribuye al proceso degenerativo. Esto se apoya en la presencia de áreas focales de astrocitos reactivos en el cerebro con AD que están desprovistos de placas seniles (51).

#### Ejemplo 7

La expresión de ADN recombinante se detectó en una variedad de tejidos, incluyendo el corazón, intestino, riñón, hígado, músculos y bazo (datos no mostrados), una observa-

ción que ha sido informada por otros, usando el mismo promotor NF-L para provocar la expresión de un gen~~e~~ heterólogo en mamíferos transgénicos (53). Desde que no se efectuó análisis de célula única, sigue siendo posible que esa expresión fuera limitada a las neuronas en todos esos tejidos. Aunque la expresión del ADN RNA recombinante se detectó en tejidos periféricos, los cambios histopatológicos se observaron sólo en el cerebro. Interesantemente, los depósitos A $\beta$  pueden ser detectados en pacientes AD, fuera del CNS en tejidos tales como la piel y el intestino, aunque sólo con consecuencias subclínicas (54). Estas observaciones sugieren que el cerebro puede ser más vulnerable a los efectos del péptido A $\beta$  en ambos, humanos y ratas.

Aún dentro del cerebro, aparecen áreas más susceptibles; pese a que la expresión del ADN recombinante a través de todo el cerebro, la neurodegeneración y la apoptosis se observaron más frecuentemente en el cortex, hipocampo y amígdala, en menor extensión en la parte posterior del cerebro y virtualmente indetectables en el cerebelo. Debe destacarse que el péptido A $\beta$  por sí mismo puede no ser capaz de inducir neurotoxicidad, pero puede actuar concertadamente con otros factores. La acumulación de A $\beta$  dentro de las células neuronales del cerebro puede hacerlas más susceptibles a diferentes desafíos o daños. Esto puede contribuir al tiempo variable de la aparición de la enfermedad. Aunque no hemos ensayado para un péptido testigo negativo, nuestra observación de un fenotipo consistente en líneas múltiples, independientes, de ratas transgénicas no deja dudas que el fenotipo neurodegenerativo es una consecuencia de la expresión del ADN recombinante; ya que el ADN recombinante está programado para producir sólo A $\beta$ , el fenotipo resultante en esas ratas puede atribuirse sólo al A $\beta$  o a una subespecie de él. Más aún, es importante anotar que otras construcciones transgénicas con el promotor NF-L, impulsando la expresión de genes he-



terólogos, no induce ninguna patología cerebral (53, 55-57), lo que indica que los cambios observados en las ratas transgénicas NF<sub>L</sub>-A $\beta$  son una consecuencia de la expresión de A $\beta$ .

Pese a la presencia de cambios profundos en nuestros cerebros transgénicos, otros rasgos de diagnóstico de AD, tales como los haces neurofibrilares y placas seniles, distinguibles con teñido de plata de Bielschowsky, no se observaron, aunque algo de inmunoteñido extracelular aparente de A $\beta$  se detectó dentro de la neuropila. Sin embargo, nosotros estaremos explorando nuestra población transgénica que envejece, para detectar la presencia de esas estructuras, aunque los haces no son necesariamente un rasgo invariable de AD<sup>1</sup>. Con respecto a las placas seniles, es concebible que las ratas nunca las desarrollen, ya que su período de vida normal no es lo suficientemente largo para permitir la formación de esas estructuras. Adicionalmente, no se descuenta que un cofactor(es) requerido para la formación de placas esté ausente en ratas. Por lo tanto, los marcados cambios patológicos en los cerebros de ratas transgénicas NF<sub>L</sub>-A $\beta$ , en ausencia de placas seniles, puede sugerir que su presencia es una consecuencia o rasgo secundario de esta enfermedad y no una causa directa de la degeneración neuronal. Además, hemos generado ratas transgénicas en las cuales A $\beta$  fue marcado extracelularmente por inclusión de la secuencia de señal N-CAM (53), sin embargo, esas ratas no han desarrollado ninguna patología, comparadas con las ratas transgénicas que expresaban A $\beta$  intracelularmente; estos resultados sugieren que la expresión intracelular de A $\beta$  conduce a cambios patológicos, mientras la expresión extracelular no lo hace. Además, nuestros resultados ahora nos permiten identificar cual rasgo de A $\beta$  (por ejemplo, su secuencia primaria, hidrofobicidad o tamaño) contribuye al fenotipo neurodegenerativo.

### Ejemplo 8

Se administró un agente a cinco grupos diferentes de ratas transgénicas ( $n = 10$ ) que expresaban el péptido A $\beta$ , cada grupo difería en dos meses de edad. La conducta de cada rata se comparó con la de ratas testigo de la misma edad, usando el laberinto de agua de Morris y se observó el fenotipo. Después de observar y detectar la conducta, cada rata fue sacrificada y ensayada para la expresión de A $\beta$ , como se describió en los ejemplos previos. El experimento se repite administrando diferentes dosis del agente.

### Ejemplo 9

Usando un anticuerpo dirigido al terminal N de p53 (19), confirmamos por inmunoteñido de secciones fijadas en formalina, que las neuronas en el cortex cerebral en ratas testigo normalmente no expresan al p53. En contraste, las neuronas corticales de ratas transgénicas A $\beta$  ( $n = 10$ ) mostraron inmunoteñido extensivo para p53. Sin embargo, se encontró que no todas las neuronas expresaban al p53; la extensión del compromiso variaba de subregión a subregión y de rata en rata, sugiriendo, tal vez, que la habilidad intrínseca para expresar el A $\beta$  intracelular no era suficiente. La adición del péptido sintético del cual fue derivado el anticuerpo, bloqueó completamente el inmunoteñido de p53. Es interesante hacer notar que, mientras la mayoría de las neuronas corticales detectables en esta rata transgénica mostraban primariamente inmunoteñido nuclear p53, un subgrupo significativo mostró ambas, localización nuclear y citoplásmica y, un subgrupo ocasional, frecuentemente dispuesto como un haz podía exhibir sólo localización citoplasmática. No está claro si la diferencia en la localización subcelular de p53 representa diferentes estados funcionales de las células o si

caracteriza respuestas de diferentes subtipos neuronales. Pese a todo, la activación de p53 es un rasgo distintivo de las ratas transgénicas y se correlaciona bien con recientes estudios in vitro, los que sugieren que A $\beta$  induce daños oxidativos (65-67), un inductor establecido de p53 (68).

*¿ Se correlaciona la activación de p53 con la acumulación de A $\beta$ ?*

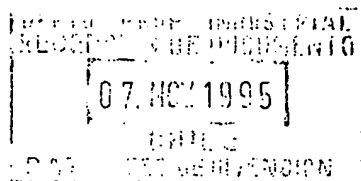
Para determinar si la expresión sostenida de A $\beta$  es requisito para la inducción de p53, seleccionamos para análisis una rata transgénica con un área bien circunscrita de células apoptóticas yuxtapuestas a un área aparentemente normal. La muerte celular por apoptosis, en contraste con la necrosis, se caracteriza por la presencia excesiva de terminales ADN 3' hidroxilo, los que pueden detectarse usando el método Terminal transferasa (TdT)-mediada dUTP-biotina-nick-end (TUNEL)(69). Desde las fuerzas relativas de las señales del núcleo marcado, células en etapas tempranas del recorrido apoptótico con cambios morfológicos marginales, pueden distinguirse de células en etapas avanzadas que tienen núcleos condensados y aún fragmentados.

Secciones seriadas del neocortex de ratas transgénicas se sometieron a tinción hematoxilina-y-eosina (H&E), TUNEL, anti A $\beta$  y anti-p53. Las neuronas corticales eran morfológicamente de apariencia normal y exhibían una morfología nuclear abierta. Como se esperaba, esas células eran TUNEL<sup>-</sup> porque no tenían acumulación de A $\beta$  y tampoco activación p53. En contraste, las neuronas corticales localizadas en el extremo inferior izquierdo revelaron un citoplasma distintamente basofílico y aparecían degenerativas. Eran débilmente TUNEL<sup>+</sup> y mostraban abundancia de ambos, A $\beta$  citoplasmático e inmunoreactividad nuclear p53. Las neuronas corticales del extremo superior derecho mostraban núcleos latamente condensados o fragmentados y

eran fuertemente TUNEL<sup>+</sup>; muchas de esas células también expresaban A $\beta$  y p53. Desde que los haces de neuronas, invariablemente sufren apoptosis coordinadamente, el análisis regional de la expresión del gene puede tomarse como respuesta representativa en células individuales. Este hallazgo demuestra que la acumulación de A $\beta$  se correlaciona perfectamente con la activación de p53.

*¿ La activación de p53, precede la muerte de la célula?*

Desde que el análisis del cortex cerebral insinuó que la expresión de p53 ocurría antes de la detección de la muerte franca de la célula, analizamos otra región del cerebro para determinar si se podía encontrar evidencia más convincente. Secciones seriadas de hipocampo de otra rata transgénica A $\beta$  se sometieron a H&E, TUNEL, y a tinción anti-p53. Se observó que las neuronas del hipocampo sufrían cambios morfológicos progresivos a través del cuerno de Amón. En la subregión CA2, las células aparecían bastante normales, no mostraban marcas de TUNEL pero tenían abundancia de inmunoreacción nuclear p53. En contraste con ratas testigo, uno puede concluir que el p53 ha sido activado, aunque las células no han sufrido apoptosis. En la unión de las sub-regiones CA2 y CA3, las células habían adquirido cambios morfológicos significativos y tenían una proporción marcadamente alterada de núcleo : citoplasma. Esas células llegaron a ser débilmente TUNEL<sup>+</sup> pero mantuvieron un alto nivel de inmunoreactividad nuclear p53, sugiriendo que p53 es necesario para que entren en el sendero apoptótico. Hacia la sub-región CA3, las células tenían estructuras y núcleos de cromatina condensada y eran fuertemente TUNEL<sup>+</sup> pero ya no eran p53 inmunoreactivas. Este hallazgo es consistente con la activación de p53 antes del inicio de la apoptosis y su desaparición más tarde en el proceso.



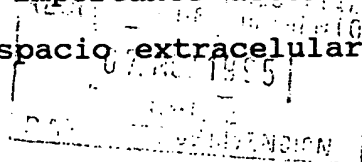
*¿Existe deposición de AB extracelular en el cerebro?*

Usando un anti-suero anti-AB (4G8) que está bien caracterizado y es ampliamente usado (70), así como anti-suero generado por nosotros, hemos detectado inmunoteñido AB extracelular en muchas de las ratas transgénicas analizadas. Como se predijo, esos depósitos se encontraron en diferentes regiones del cerebro, particularmente dentro del neocortex, hipocampo y tálamo. Las ubicaciones de las tres áreas generales pueden deducirse de secciones cerebrales paralelas tratadas con, ya sea, H&E o tinción de plata de Bielschowsky. La región superior izquierda incluye la sub-región CA1 del hipocampo y la materia blanca que lo cubre (Splenum corporis callosi). La región superior derecha cae dentro de la sub-región CA3 del hipocampo y de la materia blanca que lo cubre (Truncus corporis callosi). La región inferior izquierda se localiza dentro del tálamo (posiblemente Nucleus ventralis thalami, pars basalis).

Una vista con alta magnificación del inmunoteñido anti-AB en las tres regiones, muestra que los depósitos extracelulares parecen placas difusas. Interesantemente, esos depósitos también pueden detectarse con facilidad usando una tinción de plata cuando se encuentran no cubriendo fibras nerviosas. Esto no sólo implica que cantidades significativas de la proteína AB han sido depositadas en el espacio extracelular, sino que una vista con alta magnificación también mostró que esos depósitos asumen la apariencia de cristales de hielo y pueden representar agregados fibrilares.

*¿ Pueden provenir los depósitos extracelulares de células que están muriendo?*

Reconociendo que una neurona muriendo tiene una abundancia de AB citoplásmico, es importante determinar si el AB pudo haber sido liberado en el espacio extracelular inmediato a la muerte de la



célula. Esto es particularmente relevante, ya que no se ha determinado la forma en que A $\beta$  sale de la célula en pacientes AD. Los análisis de las células hipocámpales CA1 y CA3, en la vecindad de los depósitos de A $\beta$  mostraron evidencia de degeneración celular significativa. Por ejemplo, hay considerable escasez de neuronas dentro de la sub-región CA3 y algunas de las células restantes tienen nucléolos que se tiñen poco con hematoxilina y nucléolos que no pudieron identificarse con la tinción de plata de Bielschowsky.

Más significativamente, las células TUNEL<sup>+</sup> se encontró que traslapaban perfectamente regiones con inmunoteñido de A $\beta$  extracelular, confirmando la asociación entre muerte celular y deposición extracelular. La evidencia adicional para el daño celular se obtuvo con tinción H&E de regiones alrededor de CA1 y CA3, las que son hipocelulares. La presencia de regiones focales de basofilia, detectadas por la hematoxilina que tiñe la cromatina nuclear y que cubrían las áreas inmunoreactivas de A $\beta$ , sugieren que estos depósitos se liberan subsecuentemente con la muerte de la célula. Con alta magnificación, se puede detectar un fantasma celular junto con la desorganización de la neuropila circundante en un área marcada por basofilia distinta.

*¿ Tiene consecuencias funcionales la deposición de A $\beta$  extracelular?*

Debido a la naturaleza localizada de los depósitos de A $\beta$  y a su apariencia insoluble, es posible que las neuronas subyacentes, como meros espectadores, puedan llegar a ser impedidas funcionalmente. Guiados por el hecho que las placas seniles en AD, frecuentemente incluyen no solo depósitos extracelulares de A $\beta$ , sino neuritas distróficas y astrocitos reactivos (71), analizamos por inmunoteñido para alteraciones de la sinaptofisina y proteína ácida glial fibrilar (GFAP). Fue interesante encon-

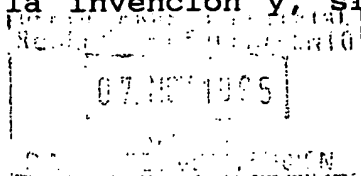
07/10/1995

trar que regiones del cerebro que normalmente tienen abundancia de astrocitos, incluyendo regiones del corpus callosum que cubre a las sub-regiones CA1 y CA3 del hipocampo, mostraban gliosis detectable. Los astrocitos comprometidos llegaron a ser activados morfológicamente, lo que dio a las áreas una apariencia más densa al inmunoteñido GFAP.

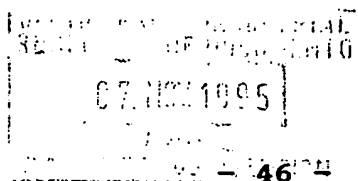
Las neuritas subyacentes comprometidas en estos depósitos extracelulares fue sugerida por un marcado incremento en la inmunotinción con sinaptofisina dentro de regiones que normalmente tienen un nivel de inmunoreactividad basal, tal como las áreas inmediatamente adyacentes a las neuronas CA1 y CA3. Desde que la inmunotinción aumentada se traslapaba precisamente con los depósitos de A $\beta$ , esto puede significar el entrapamiento de las neuritas subyacentes. Interesantemente, la presencia de inmunoreactividad de sinaptofisina también se ha demostrado en placas de AD (72). La evidencia factual para el daño real de las neuritas se obtuvo usando la tinción de plata de Bielschowsky que destacó la estructura fina de las neuritas que se extendían desde las neuronas del hipocampo. Al contrario de aquellas que no eran subyacentes a los depósitos, y que tienen estructuras finas como cabellos, muchas de aquellas encontradas subyacentes a los depósitos aparecían romas con estructuras como perillas en sus extremos. Esta observación puede muy bien sugerir daño de las neuronas vecinas y, posiblemente resultar en un segundo nivel de muerte celular.

Los ejemplos anteriores pueden repetirse con similar éxito substituyendo los reactivos descritos genérica o específicamente y/o las condiciones de operación de esta invención por las usadas en los ejemplos precedentes.

De la descripción anterior, una persona entrenada en el arte puede fácilmente evaluar las características esenciales de la invención y, sin separarse del espíritu y del



enfoque de ella, hacer varios cambios y modificaciones para adaptarla a varios usos y condiciones.

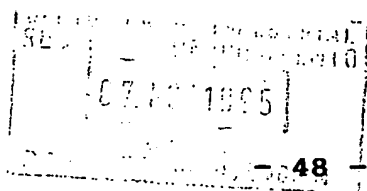




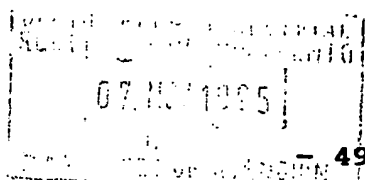
## BIBLIOGRAFIA

1. Selkoe, D.J. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 489-517 (1994).
2. Price, D.L., Borchelt, D.R. & Sisodia, S.S. Alzheimer disease and the prion disorders amyloid  $\beta$ -protein and prion protein amyloidoses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6381-6384 (1993).
3. Glenner, G.G. & Wong, C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 120, 885-890 (1984).
4. Masters, C.L. et al., Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4245-4249 (1985).
5. Kang, J. et al., The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell - surface receptor. *Nature* 325, 733-736 (1987).
6. Ponte, P. et al., A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331, 525-527 (1988).
7. Tanzi, R.E. et al., Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528-530 (1988).
8. Haass, C. et al., Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325 (1992).
9. Shoji, M. et al., Production of the Alzheimer amyloid  $\beta$  protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129 (1992).

10. Busciglio, J., Gabuzda, D.H., Matsudaira, P. & Yankner, B.A. Generation of  $\beta$ -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2092-2096 (1993).
11. Seubert, P. et al., Isolation and quantification of soluble Alzheimer's  $\beta$ -peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327 (1992).
12. Citron, M. et al., Mutation of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases  $\beta$ -protein production. *Nature* 360, 672-674 (1992).
13. Cai, X.-D., Golde, T.E. & Younkin, S.G. Release of excess amyloid  $\beta$  protein from a mutant amyloid  $\beta$  protein precursor. *Science* 259, 514-516 (1993).
14. Cotman, C.W., Pike, C.J. & Copani, A.  $\beta$ -amyloid neurotoxicity : a discussion of *in vitro* findings. *Neurobiol. Aging* 13, 587-590 (1992).
15. Price, D.L., Borchelt, D.R., Walker, L.C. & Sisodia, S.S. Toxicity of synthetic A $\beta$  peptides and modeling of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13, 623-625 (1992).
16. Wirak, D.O. et al., Deposits of amyloid  $\beta$  protein in the central nervous system of transgenic mice. *Science* 253, 323-325 (1991).
17. Jucker, M. et al., Age-associated inclusions in normal and transgenic mouse brain. *Science* 255, 1443-1445 (1992).
18. Wirak, D.O. et al., Age-associated inclusions in normal and transgenic mouse brain. *Science* 255, 1445 (1992).
19. Kawabata, S., Higgins, G.A. & Gordon, J.W. Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and neuronal loss



- in brains of transgenic mice overexpressing a C-terminal fragment of human amyloid precursor protein. *Nature* 354, 476-478 (1991).
20. Sandhu, F.A., Salim, M. & Zain, S.B. Expression of the human  $\beta$ -amyloid protein of Alzheimer's disease specifically in the brains of transgenic mice. *J. biol. Chem.* 266, 21331-21334 (1991).
  21. Kawabata, S., Higgins, G.A. & Gordon, J.W. Alzheimer's retraction. *Nature* 356, 23 (1992).
  22. Kammesheidt, A. et al., Deposition of B/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10857-10861 (1992).
  23. Quon, D. et al., Formation of  $\beta$ -amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. *Nature* 352, 239-241 (1991).
  24. Yamaguchi, F. et al., Transgenic mice for the amyloid precursor protein 695 isoform have impaired spatial memory. *NeuroReport* 2, 781-784 (1991).
  25. Lamb, B.T. et al., Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice. *Nature Gen.* 5, 22-30 (1993).
  26. Pearson, B. & Choi, T. Expression of the human  $\beta$ -amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10578-10582 (1993).
  27. Wertkin, A.M. et al., Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular  $\beta$ -amyloid or A4 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9513-9517 (1993).

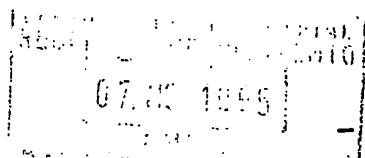


28. Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C.L. & Beyreuther, K. Human and rodent sequence analogs of Alzheimer's amyloid BA4 share similar properties and can be solubilized in buffers of pH 7.4. *Eur. J. Biochem.* 201, 61-69 (1991).
29. Fraser, P.E. et al., Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer Amyloid B-protein. *Biochemistry* 31, 10716-10723 (1992).
30. Julien, J.-P., Meyer, D., Flavell, D., Hurst, J. & Grosveld, F. Clonig and developmental expression of the murine neurofilament gene family. *Mol. Brain Res.* 1, 243-250 (1986).
31. Hinrichs, S.H., Nerenberg, M., Reynold, R.K., Khoury, G. & Jay, G. A transgenic mouse model for human neurofibromatosis. *Science* 237, 1340-1343 (1987).
32. Vogel, J., Hinrichs, S.H., Reynolds, R.K., Luciw, P.A. & Jay, G. The HIV *tat* gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* 335, 606-611 (1988).
33. Green, J.E, Hinrichs, S.H, Vogel, J. & Jay, G. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* 341, 72-74 (1989).
34. Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T. & Jay, G. *HBx* gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351, 317-320 (1991).
35. CDC. Mortality from Alzheimer disease-United States, 1979-1987. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 39, 785-788 (1990).
36. Farlow, M., et al., Clinical characteristics in a kindred with early-onset Alzheimer's disease and

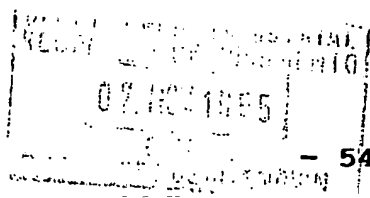
- their linkage to a G-->T change at position 2149 of the amyloid precursor protein gene. *Neurology* 44, 105-111 (1994).
37. Risse, S.C. et al., Myoclonus, seizures, and paratonia in Alzheimer disease. *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.* 4, 217-225 (1990).
38. Romanelli, M.F., Morris, J.C., Ashkin, K. & Coben. L.A. Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures. *Arch. Neurol.* 47, 847-850 (1990).
39. Hauser, W.A., Morris, M.L., Heston, L.L. & Anderson, V.E. Seizures and myoclonus in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 36, 1226-1230 (1986).
40. Wyllie, A.H. Cell Death. *Int. Rev. Cytol.* S17, 755-785 (1987).
41. Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear ADN fragmentation *J. Cell Biol.* 119, 493-501 (1992).
42. Cohen, J.J. Apoptosis. *Immunol. Today* 14, 126-130 (1993).
43. Duffy, P., Mayeux, R. & Kupsky, W. Familial Alzheimer's disease with myoclonus and 'spongy change'. *Arch. Neurol.* 45, 1097-1100 (1988).
44. Carson, D.A. & Ribeiro, J.M. Apoptosis and disease. *Lancet* 341, 1251-1254 (1993).
45. Loo, D.T., et al., Apoptosis is induced by B-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7951-7955 (1993).
46. Norton, W.T., D.A., Hozumi, I., Chiu, F. C & Brosnan, C.F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res.* 17, 877-885 (1992).

47. Delacourte, A. General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology* 40, 33-37 (1990).
48. Vijayan, V.K. et al., Astrocyte hipertrophy in the Alzheimer's disease hippocampal formation. *Exp. Neurol.* 112, 72-78 (1991).
49. Frederickson, R.C.A. Astroglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13, 239-253 (1992).
50. Eng, L.F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 8, 203-214 (1985).
51. Mucke, L., Oldstone, M.B.A., Morris, J.C. & Nerenberg, M.I. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol.* 3, 465-474 (1991).
52. Mandybur, T.I. & Chuirazzi, C.C. Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. *Neurology* 40, 635-639 (1990).
53. Begemann, M., Tan, S.-S., Cunningham, B.A. & Edelman, G.M. Expression of chicken liver cell adhesion molecule fusion genes in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9042-9046 (1990).
54. Joachim, C.L., Mori, H. & Selkoe, D.J. Amyloid  $\beta$ -protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature* 341, 226-230 (1989).
55. Byrne, G.W. & Ruddle, F.H. Multiplex gene regulation: A two-tiered approach to transgene regulation in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5473-5477 (1989).
56. Julien, J.P., Beaudet, L., Tretjakoff, I. & Peterson, A. Neurofilament gene expression in transgenic mice. *J. Physiol. (Paris)* 84, 50-52 (1992).

57. Monteiro, M.J., Hoffman, P.J., Gearhart, J.D. & Cleveland, D.W. Expression of NF-L in both neuronal and nonneuronal cells of transgenic mice: increases neurofilament density in axons without affecting caliber. *J. Cell Biol.* 111, 1543-1557 (1990).
58. Polloch, R.A., Jay, G. & Bieberich, C.J. Altering the boundaries of *Hox3.1* expression: evidence for antipodal gene expression. *Cell* 71, 911-923 (1992).
59. Selkoe, D.J. et al., Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110-to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and noneural tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7341-7345 (1988).
60. Kim, K.S. et al., Production and characterization of monoclonal antibodies reactive to synthetic cerebrovascular amyloid peptide. *Neurosci. Res. Comm.* 2, 121-130 (1988).
61. Kozak, M. Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell* 44, 283-292 (1986).
62. Carswell, S. & Alwine, J.C. Efficiency of utilization of the simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences. *Molec. Cell. Biol.* 9, 4248-4258 (1989).
63. Monteiro, M.J. & Cleveland, D.W. Expression of NF-L and NF-M in fibroblasts reveals coassembly of neurofilament and vimentin subunits. *J. Cell Biol.* 108, 579-593 (1990).
64. Ueda, H. et al, *Nature Genetics* 9, 41-47 (1995).
65. Shearman, M.S., Reagan, C.I. & Iversen, L.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1470-1474 (1994).
66. Hensley, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3270-3274 (1994).



67. Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. & Schbert, D.,  
*Cell* 77, 817-827 (1994).
68. Tishler, R.B., Calderwood, S.K., Coleman, C.N. &  
Price, B.D., *Cancer Res.* 53, 2212-2216.
69. Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A., *J.*  
*Cell. Biol.* 119, 493-501 (1992).
70. Kim, K.S. et al., *Neurosci. Res. Comm.* 2, 121-130  
(1988).
71. Price, D.L. & Sisodia, S.S., *Ann. Rev. Med.* 45, 435-  
446 (1994).
72. Masliah, E., Terry, R.D., Alford, M, DeTeresa, R. &  
Hansen, L.A., *Am. J. Pathology* 138, 235-245 (1991).





## REIVINDICACIONES

1.- Un transgene, **CARACTERIZADO** porque comprende un promotor heterólogo operablemente ligado a una secuencia de ácido nucleico que consiste esencialmente en una secuencia codificadora para péptido A $\beta$  de rata.

2.- Un transgene, de acuerdo a la Reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque el péptido A $\beta$  tiene la secuencia de la Figura 9B.

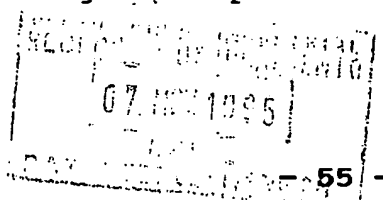
3.- Un transgene, de acuerdo a la Reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque el promotor es de una rata.

4.- Un transgene, de acuerdo a la Reivindicación 1, **CARACTERIZADO** porque el promotor es neurona-específico.

5.- Un transgene de acuerdo a la Reivindicación 4, **CARACTERIZADO** porque el promotor neurona-específico es un promotor NF-L,

6.- Un transgene de acuerdo a la Reivindicación 1, **CARACTERIZADO** además porque comprende una traducción de la secuencia de iniciación CCPuCCAUGG.

7.- Un transgene, que comprende un promotor heterólogo operablemente ligado a una secuencia de ácido nucleico que codifica para péptido A $\beta$  de rata, **CARACTERIZADO** porque la secuencia no es el gene completo normal APP.



8.- Un ácido nucléico recombinante que comprende un promotor operablemente ligado a una secuencia de ácido nucléico, **CARACTERIZADO** porque consiste esencialmente de una secuencia codificadora para un péptido A $\beta$  de rata.

9.- Un ácido nucléico recombinante de acuerdo a la Reivindicación 7, **CARACTERIZADO** porque el péptido A $\beta$  tiene la secuencia de la Figura 9B.

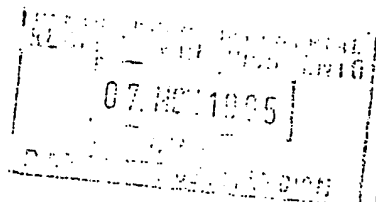
10.- Un ácido nucléico recombinante de acuerdo a la Reivindicación 7, **CARACTERIZADO** porque el promotor es un promotor NF-L de rata.

11.- Un método para aislar un compuesto por un efecto en un fenotipo mediado por la expresión de un péptido A $\beta$  transgénico en el cerebro de un mamífero, **CARACTERIZADO** porque comprende:

- administrar dicho compuesto a una rata que expresa dicho péptido A $\beta$  transgénico, y
- observar si resulta un efecto en el fenotipo.

12.- Un método para producir un mamífero transgénico que tiene un fenotipo mediado por la expresión de un péptido A $\beta$  transgénico en el cerebro del mamífero, **CARACTERIZADO** porque el péptido A $\beta$  se expresa en el cerebro de la rata en una cantidad efectiva para producir degeneración de células neuronales y/o apoptosis y/o una cantidad efectiva para causar una disfunción conductual o cognitiva, el método comprende:

- (a) introducir un transgene en el cigoto de una rata, el ácido nucléico transgénico comprende un promotor operablemente ligado a una secuencia de ácido



nucléico que codifica para el péptido A $\beta$  del mamífero,

(b) trasplantar el cigoto a un mamífero pseudo-preñado,

(c) permitiendo que el cigoto se desarrolle a término, y

(d) identificar al menos un descendiente transgénico que contenga el transgene.

13.- Un método para producir una rata transgénica que tenga un fenotipo mediado por la expresión de un péptido transgénico en el cerebro del mamífero, en donde el péptido A $\beta$  se expresa en el cerebro de la rata en una cantidad efectiva para producir degeneración de células neuronales y/o apoptosis y/o en una cantidad efectiva para causar una disfunción conductual o cognitiva, **CARACTERIZADO** porque comprende:

(a) introducir un ADN recombinante en el embrión de una rata, el ADN recombinante comprende un promotor operablemente ligado a una secuencia de ADN que codifica para el péptido A $\beta$  de tal mamífero.

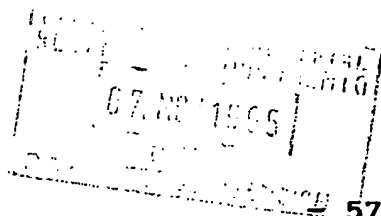
(b) transplantar el embrión a un mamífero pseudo-preñado,

(c) permitir que el embrión se desarrolle a término,

(d) identificar al menos un descendiente transgénico que contenga tal ADN recombinante, y

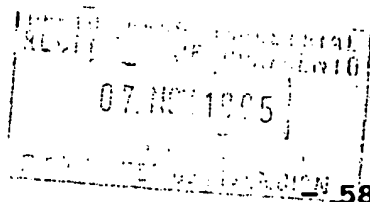
(e) criar la descendencia para formar una línea de mamíferos transgénicos que tengan dicho fenotipo.

14.- El método de la Reivindicación 13, **CARACTERIZADO** porque la introducción del transgen~~e~~ al embrión se



efectúa introduciendo un tallo celular embrionario que contenga el transgene, dentro del embrión.

15.- El método de la Reivindicación 13, CARACTERIZADO porque la introducción del transgene dentro del embrión se efectúa por infección del embrión con un retrovirus que contiene al transgene.



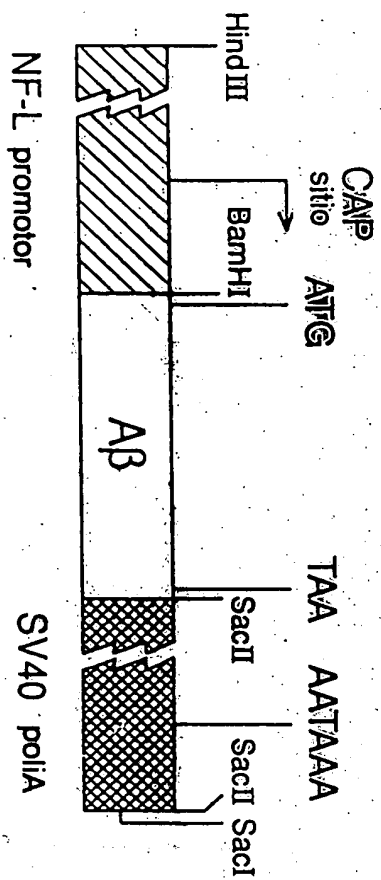


Figura 1

RECEIVED  
 07 NOV 1985  
 11 11 11  
 11 11 11

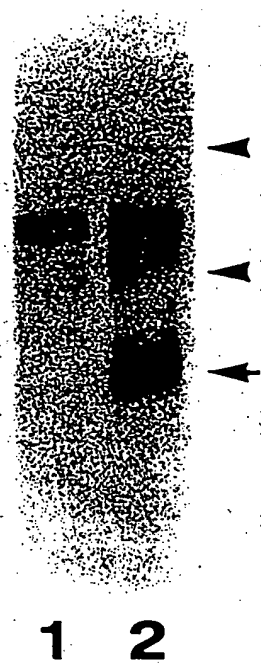


Figura 2.

RECEBIDO DE DEPARTAMENTO DE DOCUMENTAÇÃO  
07. MAR 1995 DE 1995  
FOLIO 1

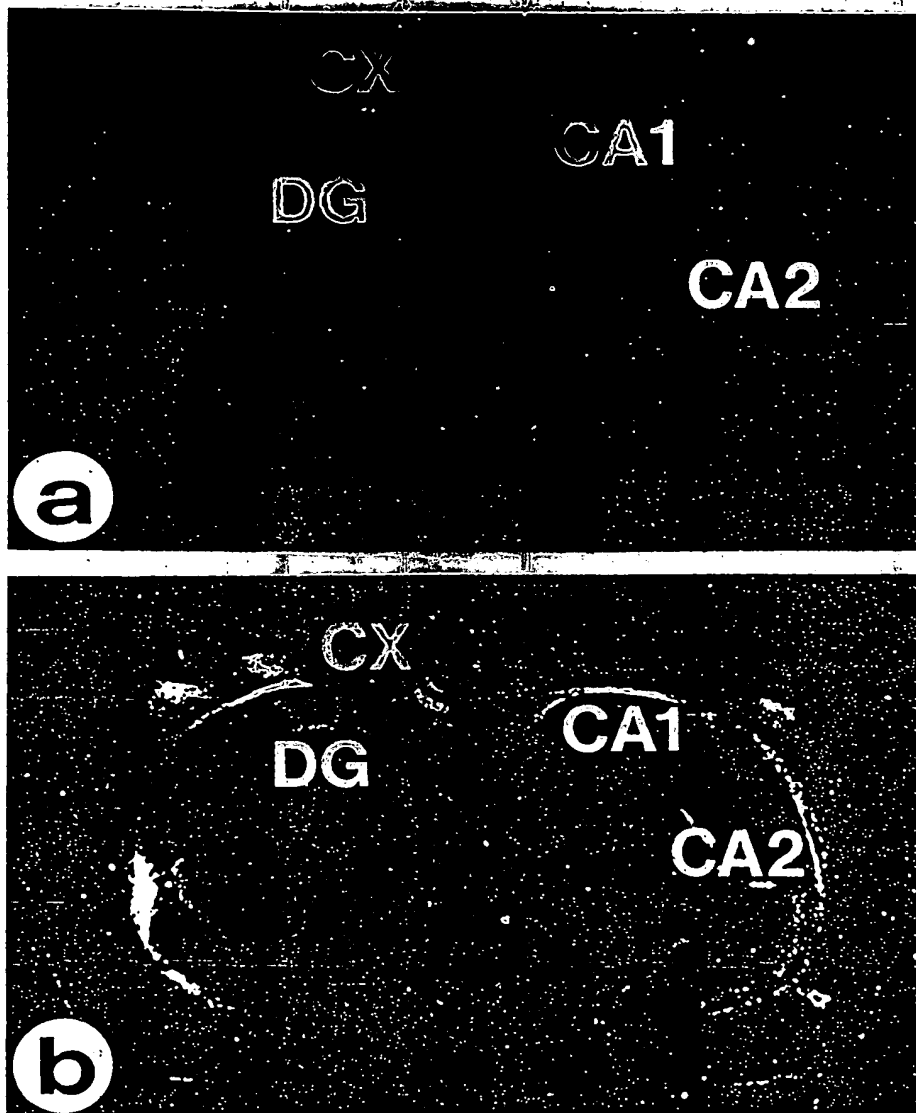
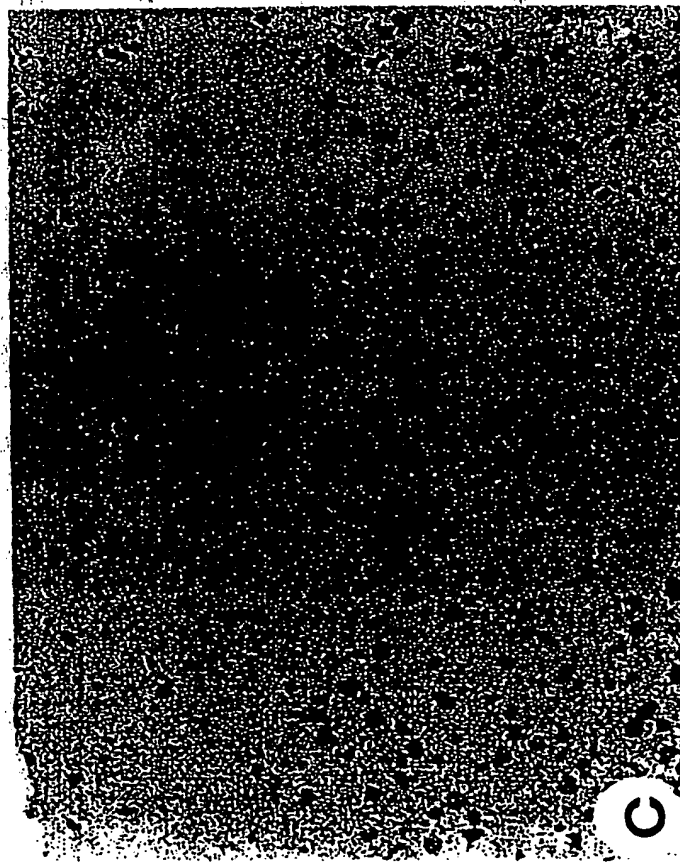
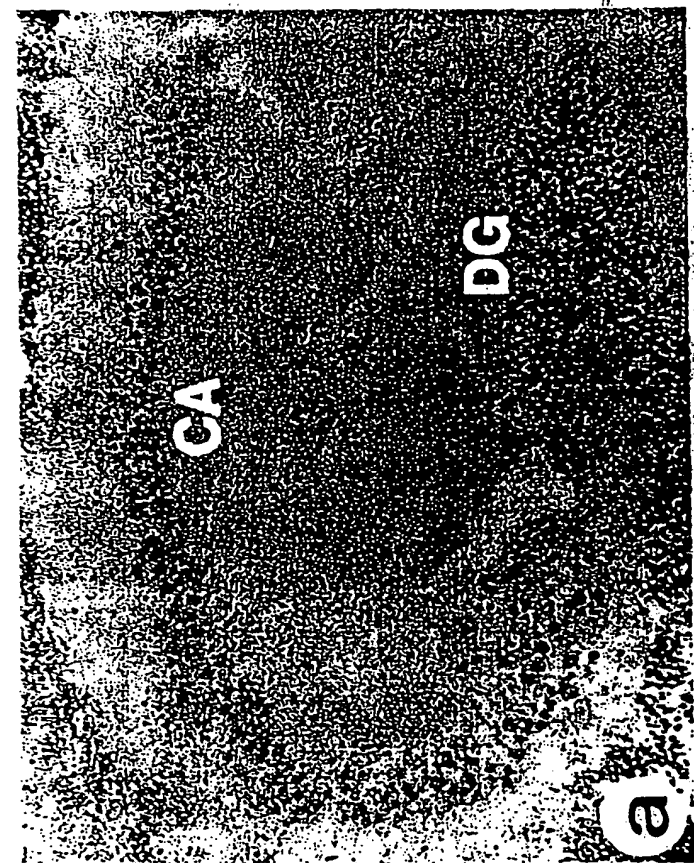


Figura 3

— Figura 4



5661-07-20  
1995



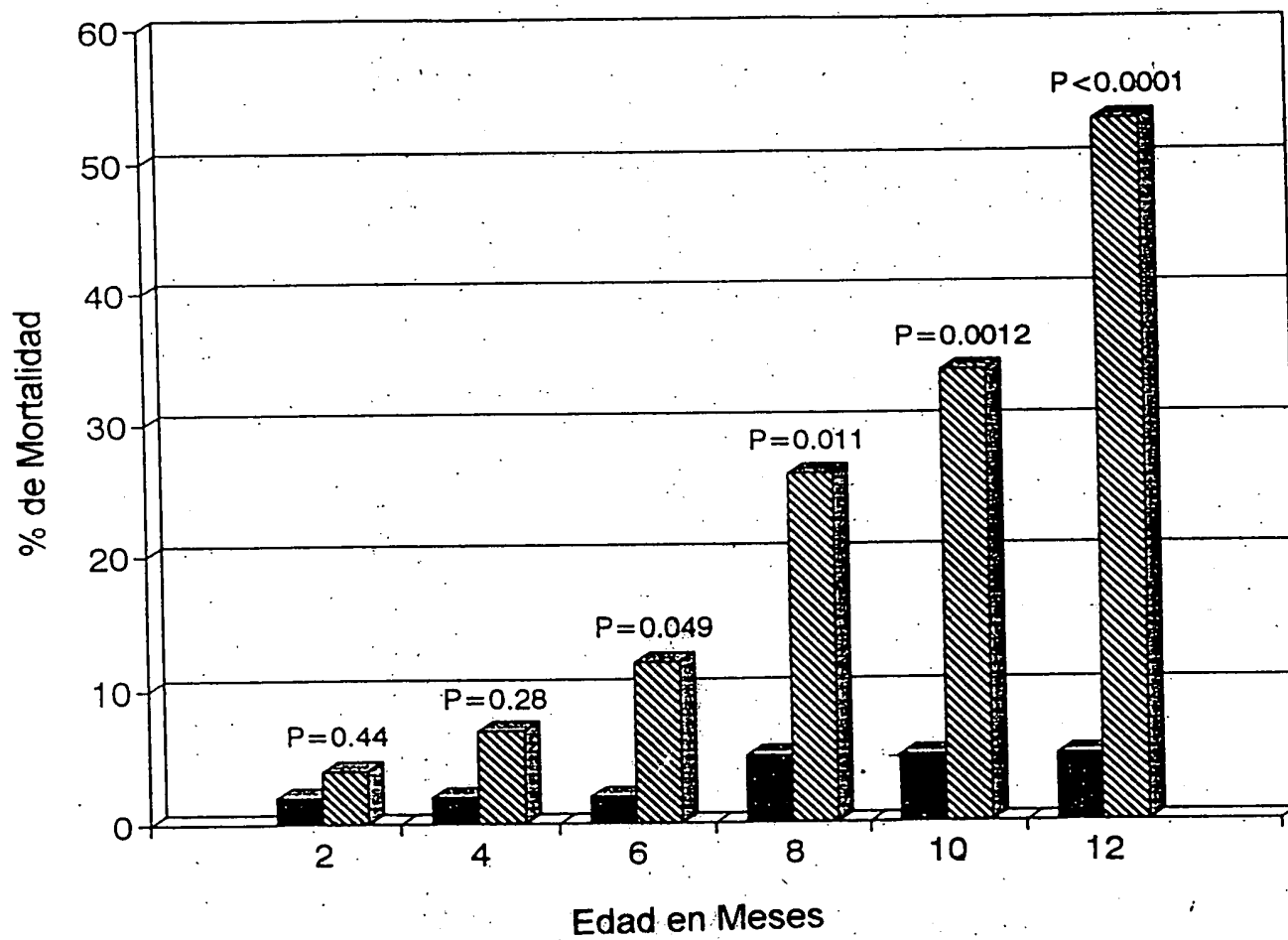
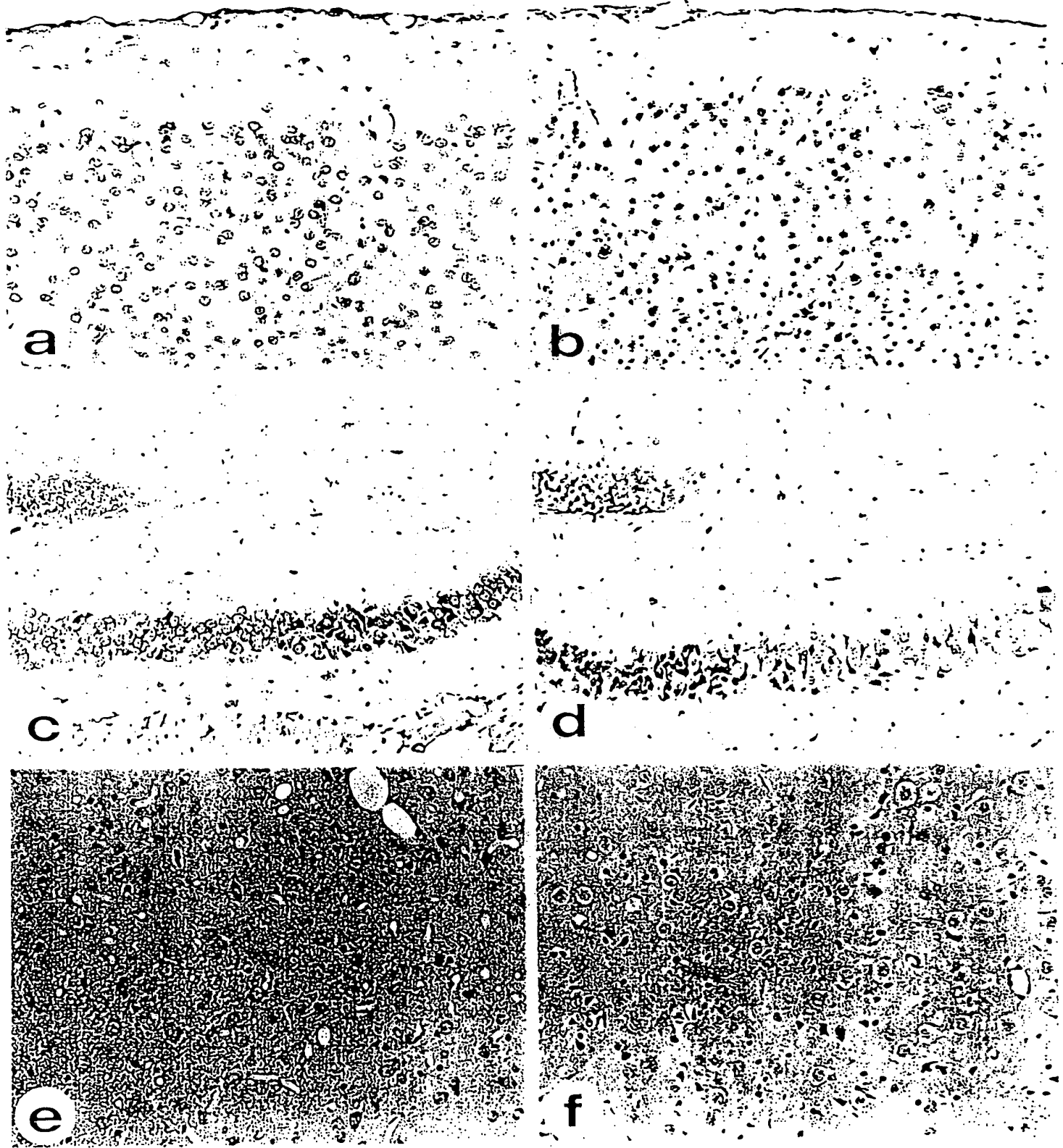


Figura 5

RECIBO  
07. NOV 1995  
07. NOV 1995

Figura 6



RECEIVED FROM: PRIME  
RECEIVED FROM: PRIME  
[07 NOV 1995]  
CHIL  
RECEIVED FROM: PRIME

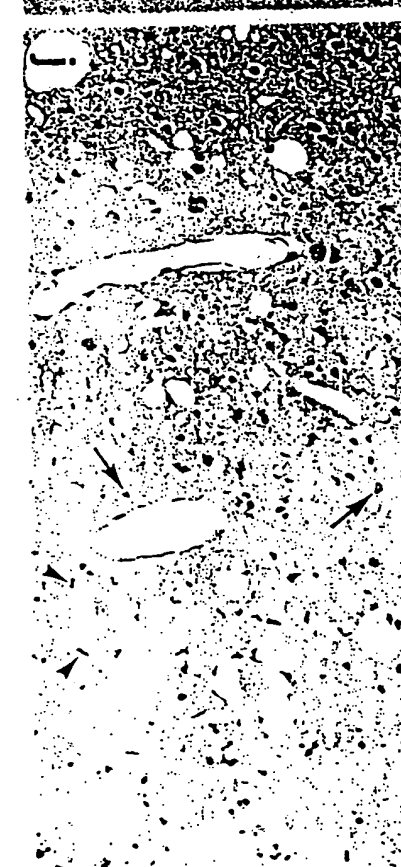
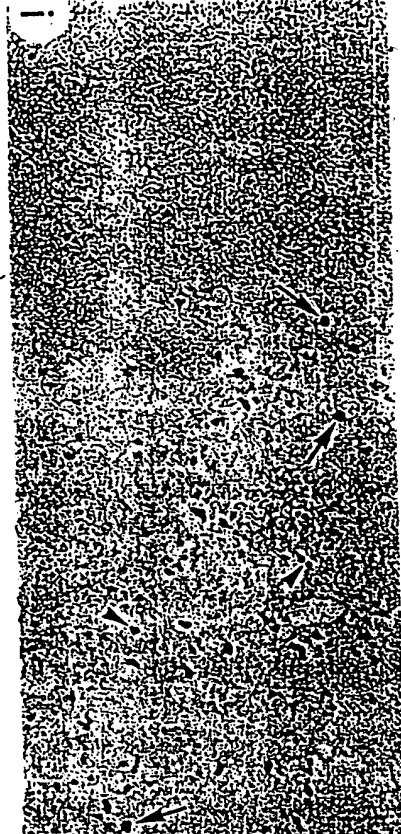
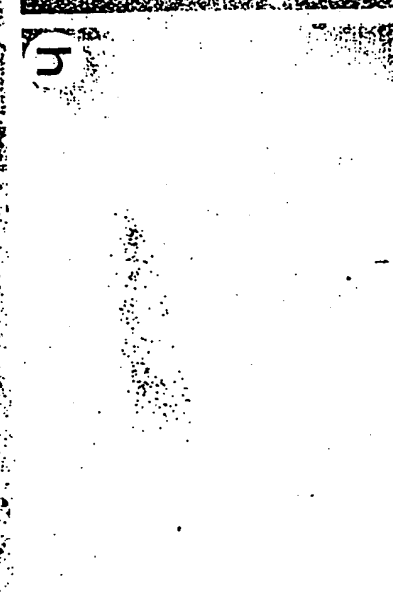
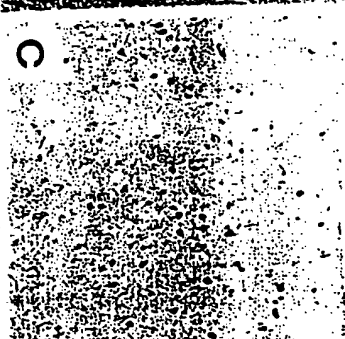
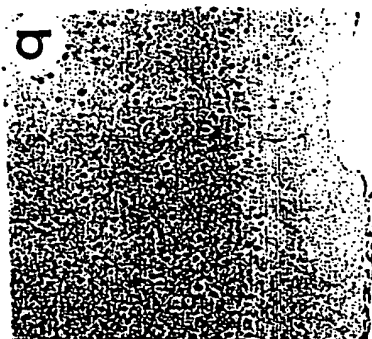


Figura 7

RECEPCION DE DOCUMENTOS  
07 NOV 1995  
CEL

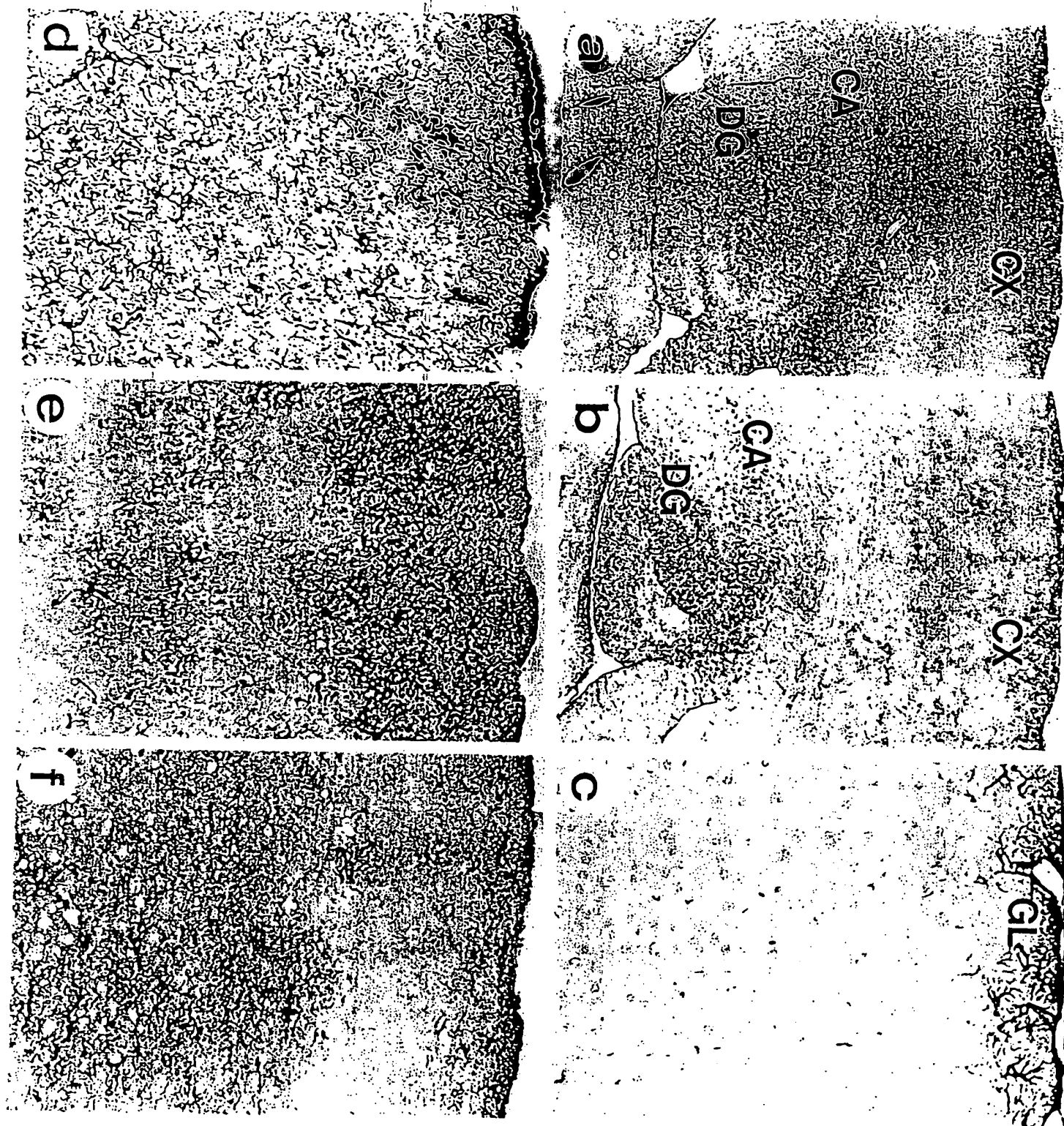


Figura 8

A. Humano      1      5      10 13      22      42  
 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGWIA

B. Murino      -----G-----F--R-----

C. HCHWA-D -----Q-----

FIGURA 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**